RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE A

ANNALES AGRONOMIQUES

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

Tome I



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

AVIS AUX LECTEURS

Des changements importants ont été récemment apportés à la parution des Annales.

I. *Série A.* — ANNALES AGRONOMIQUES

Pour l'année 1957 les Annales Agronomiques comporteront huit fascicules. Six continueront à être consacrés à l'Agronomie générale (Science du Sol, Fertilisation). Deux seront spécialement consacrés à la Physiologie végétale. Le 1er fascicule portera le n° 2 *Bis*.

On pourra s'abonner, soit :

	France	Étranger
— à la série complète : huit fascicules	**4.700**	**5.500**
— à la série " Agronomie " : six fascicules............	**3.500**	**4.100**
— aux deux fascicules de " Physiologie végétale ".....	**1.250**	**1.650**

A défaut de recommandation spéciale, les abonnements en cours seront renouvelés selon la nouvelle formule (8 fascicules).

II. FASCICULES HORS-SÉRIE

Plusieurs fascicules consacrés en entier à un même sujet paraîtront en cours d'année. Les lecteurs des Annales, abonnés ou non, pourront se procurer ces différents fascicules contre la somme de : **650** francs franco par fascicule.

POUR PARAITRE PROCHAINEMENT :

Série C. — LEGAY : **La prise de nourriture chez le ver à soie.**
SCHVESTER : **Contribution à l'étude écologique des coléoptères scolytides.**

Série E. — BOURDET : **Les constituants puriques et pyrimidiques des levures et la dégradation autolytique de l'acide ribonucléique.**

Les commandes d'ouvrages doivent être adressées au Régisseur des publications, 7, rue Keppler, Paris.

Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des publications, par virement postal, à son compte courant : Paris 9064-43 ou par bons U.N.E.S.C.O.

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE A

ANNALES AGRONOMIQUES

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler - Paris

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES SÉPARATIONS DE CONSTITUANTS CELLULAIRES DE PARENCHYMES FOLIAIRES ET APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA RÉPARTITION DES ACIDES NUCLÉIQUES

PAR

J. BAUDET
Station centrale de Physiologie Végétale, Versailles

PLAN DU MÉMOIRE

I. — INTRODUCTION

Depuis les premiers travaux de NEISH (1) et de GRANICK (2) sur l'isolement des chloroplastes, de nombreuses recherches ont été entreprises pour déterminer la composition chimique des différents organites cellulaires qui peuvent se trouver dans le mélange résultant du broyage d'un tissu végétal.

En particulier, pour le tissu foliaire, la répartition des acides nucléiques entre noyaux, chloroplastes, mitochondries, microsomes..., la

localisation, avec l'un ou l'autre de ces organites, des divers enzymes (principalement ceux du cycle respiratoire), ont été plus spécialement envisagées.

Or il est bien évident que, mis à part le cas tout à fait exceptionnel de tissus naturellement peu hydratés (comme ceux de graines, par exemple), le broyage d'un tissu et la destruction consécutive de l'architecture cellulaire entraînent la rupture de l'équilibre physico-chimique entre les différents éléments de la cellule. Cela est d'autant plus grave que le pH du jus vacuolaire est toujours légèrement acide ; en effet, le mélange de ce jus vacuolaire avec les éléments du cytoplasme, qui en sont normalement séparés, et dont le pH est différent, peut entraîner des précipitations de protéines solubles, des agrégations entre les diverses particules, et par là fausser la composition des différentes fractions obtenues lors des centrifugations successives qui devraient séparer les différents types de particules.

Comme d'autre part des questions de commodité de broyage (et de centrifugation) obligent à opérer en présence d'une notable quantité d'eau (en général au moins 4 ou 5 fois le poids du tissu végétal), on change par cette addition la pression osmotique du milieu dans lequel se trouvent les organites cellulaires.

C'est pour remédier à ces causes de perturbation que tous les auteurs qui ont abordé ce problème de séparation n'ont jamais utilisé l'eau pure comme milieu de broyage, mais

— d'une part, des solutions de sucre, glucose (3) ou plus souvent saccharose, employé à la concentration de 0,5 M (1, 2, 4 et 5) ou 0,4 M (6,7) destinées à maintenir la pression osmotique ;

— d'autre part des solutions tampon, le plus souvent phosphate $\frac{M}{15}$ ou $\frac{M}{100}$, fixant le pH aux environs de 7, pour obvier à l'inconvénient du suc vacuolaire.

Les milieux les plus fréquemment utilisés ont été des mélanges de ces deux solutions.

Pour être un régulateur efficace de la pression osmotique, le sucre ne devrait pas pénétrer dans les organites, et rien ne prouve qu'il en soit bien ainsi. De plus, examinés au microscope, les chloroplastes prennent, en suspension dans l'eau pure, un aspect granulaire ; or, dans une solution de saccharose, cet aspect est sensiblement le même, comme l'avaient déjà fait remarquer GRANICK (2) et MC CLENDON (8). Par conséquent, si la protection apportée par le sucre à l'intégrité de la structure morphologique est déjà hypothétique, il semble illusoire d'espérer une protection contre les pertes de substance, par diffusion de l'intérieur de l'organite vers le milieu extérieur.

D'autre part, l'action protectrice des tampons n'est pas immédiate : lors de la rupture de la cellule, le cytoplasme, les organites qu'il contient et le liquide vacuolaire se trouvent mis en contact instantanément, avant d'être en présence du tampon ; s'il y a eu agrégation des protéines, le tampon agira par redissolution. Et l'on peut se demander alors dans quelle mesure la présence d'une certaine quantité de sels étrangers dans le milieu ne serait pas susceptible de provoquer des pertes de substances (protéines, enzymes, acides nucléiques) constitutives des organites, par dissolution. En particulier, la question doit se poser pour les acides nucléiques qui sont très facilement solubles dans les solutions salines diluées.

En 1954, Mc Clendon avait proposé l'emploi, pour la préparation de chloroplastes, de solutions de polyéthylèneglycol (« carbowax ») qui, à cause de leur poids moléculaire assez élevé (2 500 à 6 000 suivant les échantillons choisis), ne peuvent pas diffuser dans les organites et seraient ainsi parfaitement en mesure d'assurer la régulation de la pression osmotique. En dehors du fait que la conservation d'un aspect morphologique intact des chloroplastes, proclamée par Mc Clendon, semble assez discutable d'après les résultats que nous avons obtenus en utilisant ce corps, il faut souligner que toute séparation des diverses particules en suspension dans ces milieux, par centrifugation différentielle, est rendue impossible. En effet, en présence de polyéthylèneglycol, les phénomènes d'agrégation sont tellement importants que sous l'influence d'une force centrifuge même très faible, l'ensemble des organites se trouve sédimenté, entraînant de plus la précipitation des protéines et des enzymes solubles comme l'a montré récemment Stocking (9).

En abandonnant donc, pour cette raison, les solutions de polyéthylèneglycol, incapables de permettre une séparation par centrifugation différentielle pour l'isolement des organites cellulaires, nous avons voulu comparer les résultats obtenus dans le milieu classique (saccharose tamponné), dans un milieu salin dilué et dans l'eau pure, afin de pouvoir juger plus valablement leurs avantages et leurs inconvénients respectifs.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1. Matériel.

Nous avons utilisé, pour le broyage, des feuilles de Tabac, variété White Burley, poussé en serre dans des pots de fleuriste sur terre enrichie en éléments fertilisants.

2. Milieux d'extraction.

1° Eau pure. (Eau permutée, de résistivité 40 000 à 60 000 ohm/cm).

2° Solution saline semblable à la solution de Chambers utilisée comme solution isotonique en microbiologie :

5,20 g	K Cl	pour 1 000 cc.
1,75	NaCl	
2,50	Citrate de Na $\frac{5}{2}$ H_2O	
0,68	PO_4H_2K	
1,74	PO_4HNa_2, 12 H_2O	

la concentration en phosphate ainsi réalisée correspondant à un tampon $\frac{M}{100}$ de pH voisin de 7.

3° Solution tampon de phosphate $\frac{M}{15}$, 0,4 M en saccharose, soit pour 1 litre

11,941 g	PO_4HNa_2 12 H_2O
4,039	PO_4H_2K
136,800	Saccharose.

Broyage.

Des lots identiques du même poids frais (12,5 g) de limbe de feuilles (les nervures principales et les grosses nervures secondaires ayant été enlevées) sont broyés dans les mêmes conditions de durée et de température (au voisinage de zéro), dans les différents milieux : le broyage est effectué au broyeur Servall pendant une minute, à la vitesse maximum avec 30 cc de liquide. Le jus est filtré à travers un tissu serré (percale fine) et le résidu est passé à nouveau une minute au broyeur avec une dizaine de centimètres cubes de solution vierge. Les deux extraits sont réunis et le volume amené à 50 cm^3. (Toutes ces opérations étant effectuées avec le maximum de précautions pour que la température ne s'élève pas au-dessus de quelques degrés au-dessus de zéro.)

Fractionnement.

40 cm^3 sur les 50 sont utilisés pour le fractionnement des divers types d'organites cellulaires, les 10 cm^3 restant servant pour des déterminations particulières (chlorophylle totale, azote,...).

1° Une première centrifugation, de 15 minutes et quelques dizaines de g, est effectuée dans une centrifugeuse refroidie, tournant à la vitesse la plus faible qu'on puisse stabiliser avec cet appareil. Le culot c_1 obtenu est remis en suspension dans environ 10 cm^3 de solution d'origine (eau, solution saline, tampon saccharosé) et recentrifugé dans les mêmes con-

ditions, le surnageant de ce lavage étant joint au premier surnageant pour la deuxième centrifugation.

2° 2e centrifugation, de 20 minutes et 20 000 g, avec la même centrifugeuse, au maximum de sa vitesse.

Elle donne un culot c_2 et un surnageant qu'on soumet à une

3° 3e centrifugation, de 50 minutes et une force centrifuge de plus de 100 000 g (grâce à une centrifugeuse Spinco, tournant à 40 000 tours/minute.

On obtient ainsi un culot c_3 et un surnageant parfaitement limpide.

4° Une quatrième fraction est obtenue en précipitant les protéines restées en solution par addition d'acide trichloracétique à 20 p. 100 (ajouté à raison de 1 volume pour 3 volumes de surnageant). Ce précipité, centrifugé et lavé à l'acide trichloracétique dilué, constitue la 4e fraction, c_4.

Dosages.

En plus du dosage des acides nucléiques, nous avons été amené, pour déterminer l'importance des fractions elles-mêmes, et de leurs divers constituants, à doser la chlorophylle et l'azote protéique. Sur chacune des quatre fractions, on détermine donc successivement :

1° La chlorophylle par extraction des pigments dans l'acétone à 80 p. 100 et dosage au spectrophotomètre en utilisant des coefficients de Mc Kinney (10) pour les longueurs d'onde 645, 652 et 663 mμ.

2° Les acides nucléiques en utilisant une méthode dérivée de celle d'Ogur et Rosen (11) : après les différents lavages de culots, ayant pour but d'éliminer les substances pouvant interférer dans les déterminations, l'acide ribonucléique est extrait par l'acide perchlorique normal à froid, et l'acide désoxyribonucléique par l'acide perchlorique demi normal à 70°. Pour les deux acides on détermine l'absorption dans l'ultra-violet (au moyen d'un spectrophotomètre Beckman DU) et les sucres sont dosés colorimétriquement, le ribose avec l'orcinol, et le désoxyribose avec la diphénylamine. Dans les deux cas, les chiffres obtenus sont comparés avec ceux que donne une gamme de solutions étalons établies à partir d'acides nucléiques commerciaux mis en solution perchlorique normale ou demi-normale suivant le cas. Les résultats sont par suite exprimés directement en poids d'acide nucléique.

Pour les dosages dont il est fait état dans ce travail, la différence a toujours été inférieure à 10 p. 100 entre les données des sucres et celles de l'absorption en ultra-violet, sauf dans quelques cas où la présence de saccharose a entraîné des incertitudes.

3° L'azote protéique. Après l'extraction perchlorique des acides nucléiques, on peut considérer que le résidu représente la partie protéique de la fraction considérée. On y détermine donc simplement l'azote par microkjeldahl.

III. — RÉSULTATS.

Le Tableau I donne la répartition de l'azote protéique, des acides nucléiques et de la chlorophylle dans les différents culots provenant du fractionnement des 3 suspensions réalisées dans les 3 milieux considérés.

Après broyage des feuilles, ces trois suspensions contenaient respectivement, pour les 40 cm³ analysés (correspondant donc à 10 g de feuilles) :

	Chlorophylle (mg)	Azote protéique (mg)
Suspension dans l'eau pure	8,945	19,50
Suspension dans la solution saline	8,720	19,90
Suspension dans le tampon saccharose	6,775	15,70

Les chiffres de la chlorophylle et de l'azote protéique montrent que le rendement du broyage est mauvais lorsque l'on emploie une solution de saccharose : en effet, il ne passe en suspension, par rapport à ce qu'on obtient avec l'eau pure ou la solution saline, que 75 ou 80 p. 100 de la chlorophylle et de l'azote protéique.

TABLEAU I

Répartition de l'Azote protéique, des Acides nucléiques, de la chlorophylle, dans les différentes fractions, en fonction du milieu de préparation.

(Les résultats sont exprimés en mg pour 40 cm³ de suspension, 10 g de matière fraîche).

	Azote protéique	Acide ribot-nucléique	Desoxy-ribo nucléique	Chlorophylle
Fraction I (noyaux, amidon, chloroplastes)				
Eau	1,25	0,400	0,650	0,250
Solution saline	0,73	0,275	0,520	0,380
Tampon saccharose	1,37	0,245	0,660	0.770
Fraction II (chloroplastes, noyaux, mitochondries, amidon)				
Eau	6,50	2,150	0,750	8,55
Solution saline	5,40	1,025	0,620	8,40
Tampon saccharose	9,30*	1900*	?	7,50*
Fraction III (mitochondries et surtout microsomes)				
Eau	0.9	1,55	ε	0,070
Solution saline	0,7	1,60	ε	0,085
Tampon saccharose	0,6	1,22	ε	0,070
Fraction IV (Protéines)				
Eau	6,50	0,495	—	—
Solution saline	9,75	1,320	—	—
Tampon saccharose	7,40	1,100	—	—

(*) Résultats certainement trop forts, dûs aux difficultés créées par la présence du saccharose.

D'autre part, il faut souligner la difficulté de dosage, consécutive à la présence du saccharose, qui doit être éliminé avant les extractions de la chlorophylle et des acides nucléiques. Les lavages que cela entraîne

sont autant de sources d'erreurs supplémentaires et c'est la présence du saccharose qui est cause de l'incertitude qui existe au sujet des déterminations de l'azote protéique, des acides nucléiques, et aussi de la chlorophylle dans le 2e culot, les deux premières déterminations étant manifestement trop fortes.

S'il est impossible de préciser très exactement la nature des organites qui constituent les différents culots de sédimentation, la teneur en chlorophylle, caractéristique des chloroplastes, et la teneur en acides désoxyribonucléiques, très vraisemblablement localisés dans les noyaux, indique que le premier culot renferme des noyaux avec quelques chloroplastes, alors que le second est essentiellement constitué par des chloroplastes avec peu de noyaux (sans doute à peu près autant cependant que dans le premier culot, mais pour une proportion de chloroplastes infiniment plus forte).

Il convient de ne pas oublier, bien qu'on ne s'intéresse pas spécialement à lui ici, l'amidon qui se trouve présent dans les deux premiers culots. Le 3e culot serait essentiellement constitué par les particules submicroscopiques « microsomes » ou « granulations cytoplasmiques ». Quant aux mitochondries, bien qu'on n'ait d'ailleurs aucune démonstration rigoureuse de leur existence, il est logique de penser qu'elles existent dans les cellules de la feuille, et de par les dimensions qu'on leur attribue, il est vraisemblable qu'elles se trouveraient surtout dans le 2e culot, leurs débris pouvant contaminer le 3e.

Les organites auraient aussi la répartition qui est indiquée dans la première colonne du tableau.

C'est la teneur en acide ribonucléique des différentes fractions qui, dans le cas des trois milieux d'extraction envisagés, montre la plus grande variation et qui, par suite, nous semble la détermination la plus intéressante.

En effet, pour un total d'acide ribonucléique de l'ordre de 4,5 mg pour les 40 cm^3 de suspension, (chiffre sans doute trop fort dans le cas du tampon saccharose, comme on l'a vu), 0,5 mg seulement se trouve dans le précipité protéique ayant résisté à la centrifugation de 100 000 g dans l'eau pure, alors que l'on trouve 1,3 et 1,1 mg dans la même fraction lorsque la séparation est faite dans la solution saline ou le tampon saccharose.

Deux interprétations de cette différence sont possibles :

1° Phénomène d'agrégation dans le cas de l'eau, causant un enrichissement, des premiers culots, en acide ribonucléique notamment, aux dépens du surnageant.

2° Au contraire, extraction des acides nucléiques par les solutions salines qui, de l'intérieur des organites, passent en solution et que l'on retrouve dans le surnageant.

En faveur de la deuxième hypothèse, on peut constater que la répartition de l'azote protéique ne semble pas confirmer un phénomène d'agrégation.

Pour vérifier la possibilité d'une solubilisation, par les solutions salines, des acides nucléiques constitutifs de certains organites, nous avons réalisé le même genre de séparation, mais en faisant intervenir la durée des opérations de fractionnement.

Si, en effet, il y a dissolution, ce n'est vraisemblablement pas là un phénomène instantané, et une suspension dans un milieu où la solubilisation peut se produire doit montrer des différences de répartition des acides nucléiques en fonction du temps.

Le tableau II donne les résultats d'une séparation qui, par rapport à celle que représente le tableau I, a été modifiée de la façon suivante :

Tableau II

Influence de la durée du fractionnement sur la répartition de l'azote protéique, de la chlorophylle et de l'acide ribonucléique dans les différentes fractions dans l'eau pure et dans le tampon-saccharose.

(Résultats exprimés en mg pour 40 cm³ de suspension, correspondant à 6,6 g de matière fraîche).

	Fractionnement suivant le broyage		Fractionnemet après 24 heures	
	Eau	Tampon saccharose	Eau	Tampon saccharose
1re fraction (50 g) :				
Azote protéiqué	0,68	0,40	0,80	0,42
Chlorophylle	0,11	0,005	0,225	0.168
Acide ribonucléique	0,45	0,25	0,52	0,29
2e fraction (2000 g) :				
Azote protéique	5,60	1,80	7,18	1,44
Chlorophylle	2,75	1,21	3,12	1,30
Acide ribouucléique	3,85	0,65	4,0	0,50
3e fraction (20 000 g) :				
Azote protéique	0,70	1,0	0,805	0,595
Chlorophylle	0,31	0,36	0,16	0,36
Acide ribonucléique	0,725	0,40	0,62	0,275
4e fraction (précipité trichlooacétique) :				
Azote protéique	6,60	7,60	5,90	6,58
Chlorophylle	0	0	0	0
Acide ribonucléique	2,15	4,30	1,95	3,40

La dernière centrifugation, de 100 000 g, a été supprimée, mais il a été intercalé entre la fraction I et la fraction II une nouvelle centrifugation (de 15 minutes et 2 000 g). Les 2e et 3e fractions de cette expérience correspondent donc à la fraction II de la première expérience, et le précipité trichloracétique à l'ensemble fraction III et fraction IV (précipité) du premier cas.

D'autre part, les chiffres de l'acide desoxyribonucléique, beaucoup plus douteux que les autres déterminations, n'ont pas été indiqués.

Nous n'avons mis en parallèle, cette fois-ci, que le broyage dans l'eau pure et le broyage dans le tampon-saccharose, qui est une solution saline de concentration déjà notable en ions Na^+ et K^+.

Les broyages ont été effectués sur 2 fois 16,5 g de limbes de feuilles, le volume final des suspensions étant de 100 cm^3 ; 40 cm^3 de chacune des deux suspensions ont subi la séparation par centrifugation différentielle immédiatement après broyage, tandis que pour 40 autres centimètres cubes celle-ci n'a eu lieu que 24 heures après (la suspension était restée en glacière pendant ce temps).

On peut voir que l'augmentation, après 24 heures, de la quantité d'azote protéique, de chlorophylle et d'acide ribonucléique est faible dans les deux premières fractions dans le cas de la suspension aqueuse.

Pour le tampon-saccharose au contraire, à l'exception du premier culot, d'ailleurs peu important au point de vue de sa masse totale, toutes les fractions montrent, dans la séparation après 24 heures de macération, une diminution du taux de l'azote protéique et des acides ribonucléiques.

Dans le cas de l'eau, le bilan pour l'acide ribonucléique permet de retrouver après 24 heures d'attente 7,09 mg, dont 5,14 à l'état particulaire, contre 7,18 mg, dont 5,03 particulaires, pour une centrifugation suivant immédiatement le broyage.

Si l'on se réfère aux acides nucléiques, les phénomènes d'agrégation pour une suspension d'organites dans l'eau pure ne semblent pas perturber de façon appréciable les déterminations dans les différentes fractions. Par contre, si l'on emploie le tampon-saccharose, il semble y avoir, en fonction du temps, non seulement perte d'acide ribonucléique de la part des organites en suspension, mais de plus disparition d'une notable fraction de cet acide ribonucléique, qu'on ne trouve plus dosée.

Sur les 5,6 mg, dont 1,3 particulaires, quantités trouvées dans les différentes fractions lorsque les centrifugations suivent immédiatement le broyage, on n'en retrouve plus en effet, après 24 heures, que 4,5 mg, dont 1,06 particulaires. (Il est probable que la partie non dosée, qui n'a par conséquent pas été précipitée par l'acide trichloracétique, est constituée par des produits dépolymérisés de dégradation d'acides nucléiques et non par les acides nucléiques eux-mêmes.)

IV. — CONCLUSION.

Les résultats que nous avons obtenus nous indiquent que, lorsqu'on veut déterminer les acides nucléiques préexistant dans les différentes fractions cellulaires, l'emploi de l'eau pure pour le broyage et les fractionnements consécutifs est supérieur à l'utilisation de solutions salines.

Il faut d'ailleurs souligner que le choix du liquide du broyage et de l'extraction dépend du but final, et que ce choix serait probablement différent s'il s'agissait de suivre dans le fractionnement des substances telles que les éléments minéraux ou des lipides, par exemple.

Si cette étude de fractionnement a été faite en vue de la détermination des acides nucléiques, c'est parce que la localisation de ces substances dans les différentes fractions cellulaires constitue un problème physiologique, en particulier pour les chloroplastes, au sujet desquels l'incertitude règne encore à ce point de vue : alors que Mc Clendon (4), Wildman et Jagendorf (6) utilisant, pour leurs séparations, des tampons saccharoses, concluent à l'absence d'acides nucléiques dans les chloroplastes, certains cytologistes, et récemment encore Metzner (12) aboutissent à la conclusion opposée.

On peut en effet concevoir que si les chloroplastes contiennent des acides nucléiques, mais en petite quantité seulement, les méthodes utilisées pour la préparation des organites conduisent à des pertes telles que l'on soit amené à nier leur présence dans les chloroplastes.

Nos chiffres ne nous donnent pas une évidence de l'absence d'acides nucléiques dans les chloroplastes, mais, sans apporter de preuve définitive pour ou contre la présence d'acides nucléiques dans ces organites, ils montrent qu'il faut être très prudent dans l'interprétation des résultats expérimentaux à ce sujet.

RÉSUMÉ

Il a été fait une comparaison expérimentale et une analyse critique des différents milieux aqueux utilisés pour la séparation des organites cellulaires, en se basant essentiellement sur la teneur en acides nucléiques. On en conclue que l'utilisation des solutions de saccharose tamponné est à rejeter à ce point de vue et que les méthodes ne permettent pas encore de conclure définitivement quant à la présence ou à l'absence d'acides nucléiques dans les chloroplastes.

SUMMARY

An experimental study and critical evaluation are presented of different aqueous media used for the separation of cellular organic-matter, based mainly on the contents in nucleic acids. It is suggested that buffered saccharose solutions should not be used to this end and that method so fare applied are unsuitable for a precise determination of the presence or absence of nucleic acids in chloroplasts.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein experimenteller Vergleich und eine kritische Prüfung der verschiedenen wässerigen Lösungen, die zur Trennung der Zellorganiten angewendet werden,

wurden unternommen und zwar indem man hauptsächlich den Nukleinsäuren, gehalt berücksichtigte. Man schloss daraus, dass die Anwendung von gepufferten Rohrzuckerlösungen in dieser Beziehung hier zu verwerfen ist und, dass die verschiedenen Verfahren es noch nicht erlauben das Verhandensein oder die Abwesenheit von Nukleinsäuren in den Chloroplasten endgültig zu beweisen.

РЕЗЮМЕ

Ж., БОДЭ. (Центральная станция Физиологии растений, Версаль.)

Было сделано опытное сравнение и критический анализ различных водных сред употребляющихся для разделения клеточных органитов (= солей органических кислот), основываясь преимущественно на содержании нуклеиновых кислот. Выводится заключение, что употребление растворов тампонированного сахара нужно отбросить и что теперешние методы еще не позволяют окончательных заключений относительно присутствия или отсутствия нуклеиновых кислот в хлоропластах.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) NEISH (A. C.). — Separation of chloroplasts, a study of factors affecting their floculation and the calculation of the chloroplast content of leaf tissue from chemical analysis. *Biochem. J.*, **33**, 1939, (293-299).

(2) GRANICK (J.). — Quantitative isolation of chloroplasts from higher plants. *Am. J. Bot.*, **25**, 1938, (558-560).

(3) WEIER (T. E.) and STOCKING (C. R.). — Analysis of leaf homogenates. I — Nuclear contamination and disorganized chloroplasts. *Am. J. Bot.*, **39**, 1952, (720-726).

(4) Mc CLENDON (J. H.). — The intracellular localization of enzymes in tobacco leaves : I — Identification of components of the homogenate. *Am. J. Bot.*, **39**, 1952, (275-282).

(5) DUBUY (M. G.), WOODS (M. W.) and LACKEY (M. D.). — Enzymatic activities of isolated normal and mutant mitochondria and plastids of higher plants. *Science*, **111**, 1950, (572-574).

(6) JAGENDORF (A. T.) and WILDMAN (S. G.). — The proteins of green leaves : VI — Centrifugal fractionation of tobacco leaf homogenates and some properties of isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, **29**, 1954, (270-278).

(7) JAGENDORF (A. T.). — Purification of chloroplasts by a density technic. *Plant Physiol.*, **30**, 1955, (138-143).

(8) Mc CLENDON (J. H.). — The physical environment of chloroplasts as related to their morphology and activity in vitro. *Plant Physiol.*, **29**, 1954, (448-458).

(9) STOCKING (C. R.). — Precipitation of enzymes during isolation of chloroplasts in carbowax. *Science*, **123**, 1956, 1032.

(10) Mc KINNEY (G.). — Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **160**, 1941, (315-322).

(11) OGUR (M.) and ROSEN (G.). — The nucleic acids of plant tissue : I — The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, **25**, 1950, (262-276).

(12) METZNER (H.). — Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nukleinsäuren in Chloroplasten. *Biol. Zent.*. **71**, 1952, (257-272).

SÉPARATION ET DOSAGE DE FAIBLES QUANTITÉS DE COMPOSÉS PHOSPHORÉS « ACIDO-SOLUBLES »

PAR

G. DUCET et I. MENCL
Station centrale de Physiologie Végétale, Versailles.

Pour séparer et doser les divers composés phosphorés solubles végétaux, nous avons utilisé une méthode de fractionnement par chromatographie sur colonne échangeur d'anions. La méthode a été mise au point par KHYM et COHN pour séparer les esters phosphoriques des oses et de leurs dérivés. Ils utilisent une colonne de résine Dowex 1 (X 8) d'une longueur de 12 cm et de 0,86 cm^2 de section, ce qui permet de séparer et doser 5 à 10 mg de chacun des corps suivants :

G1P, G 6P, F 6P, R 5P, AMP, ADP, ATP, PGA, HDP, Phosphore minéral (Pm) [1].

Pour faire la séparation complète, KHYM et COHN utilisent un collecteur de fractions et le volume total des solutions requises pour la séparation est d'environ 7 l.

Les divers composés phosphorés des végétaux, extractibles soit par l'alcool à diverses concentrations, soit par les acides trichloracétique ou perchlorique, représentent un faible pourcentage de la matière organique. Pour obtenir les quantités utilisées par KHYM et COHN dans leurs séparations, il faudrait extraire 100 à 200 g de végétal, ce qui est pratiquement impossible si l'on veut étudier la cinétique de ces composés.

Nous avons modifié les conditions opératoires et il nous est possible de séparer et doser environ 20 γ de phosphore de chacun des divers composés phosphorés. Le volume total de solutions nécessaires pour cette séparation est 500 à 600 ml et le fractionnement dure de 8 à 10 h.

Nous avons utilisé, pour le dosage du phosphore, une modification

(1) Nous utilisons les abréviations suivantes :

Glucose 1 PO_4	GIP	Acide phosphoglycolique	PG_0A
Fructose 6 PO_4	F6P	Acide phosphoglycérique	PGA
Glucose 6 PO_4	G6P	Ribulose di phosphate	RDP
Fructose diphosphate	HDP	Sedoheptulose phosphate	Sed P
Ribose 5 Phosphate	R5P	Mannose phosphate	MP
Ribulose 5 Phosphate	Ru5P	Adenosine mono) phosphate	AMP
		di) —	ADP
		tri) —	ATP

de la méthode de BERENBLUM et CHAIN qui nous permet de doser de 0,2 à 50 γ de phosphore dans une prise d'essai.

Nous avons appliqué ces méthodes à l'étude des composés phosphorés de feuilles, ainsi qu'à la phosphorylation oxydative de mitochondries de tissus végétaux ou animaux.

MÉTHODES

I. — DOSAGE DU PHOSPHORE MINÉRAL

La méthode de FISKE et SUBBAROW n'est pas suffisamment sensible pour doser moins de 5 γ de phosphore, avec les spectrophotomètres dont nous disposons. Seule, l'utilisation de chlorure stanneux comme réducteur permet d'obtenir une coloration bleue intense avec moins de 1 γ de phosphore.

Nous avons d'abord utilisé ce réducteur en solution aqueuse selon diverses méthodes décrites, en particulier celle de ZINZADZE, mais nous avons été gênés très souvent par des réactions parasites difficiles à contrôler. Tantôt les « blanc » donnaient des colorations bleues très intenses, tantôt les concentrations d'acide diminuaient, la coloration et les résultats devenaient erratiques. De plus, les solutions de molybdate et de chlorure stanneux doivent être renouvelées très souvent, ce qui est une gêne quand un ou deux dosages seulement sont à effectuer.

Nous avons préféré utiliser une modification de la méthode de BERENBLUM et CHAIN analogue à celle décrite par ZELLER, qui nécessite l'extraction du complexe phosphomolybdique dans l'alcool isobutylique et qui possède une plus grande tolérance pour les conditions de concentration en acide et en molybdate. De plus, il est assez facile de faire des dosages en série, puisque la coloration bleue n'est obtenue qu'après addition d'une solution concentrée de chlorure stanneux à la solution alcoolique de complexe phosphomolybdique et que cette dernière peut se conserver assez longtemps à l'abri de la lumière.

1. — Solutions.

Molybdate d'ammonium, très pur, cristallisé : 2,5 p. 100. La conservation est de courte durée mais est améliorée en milieu acide.

Alcool isobutylique redistillé.

Alcool éthylique redistillé en présence de potasse.

SO_4H_2 : 10 N.

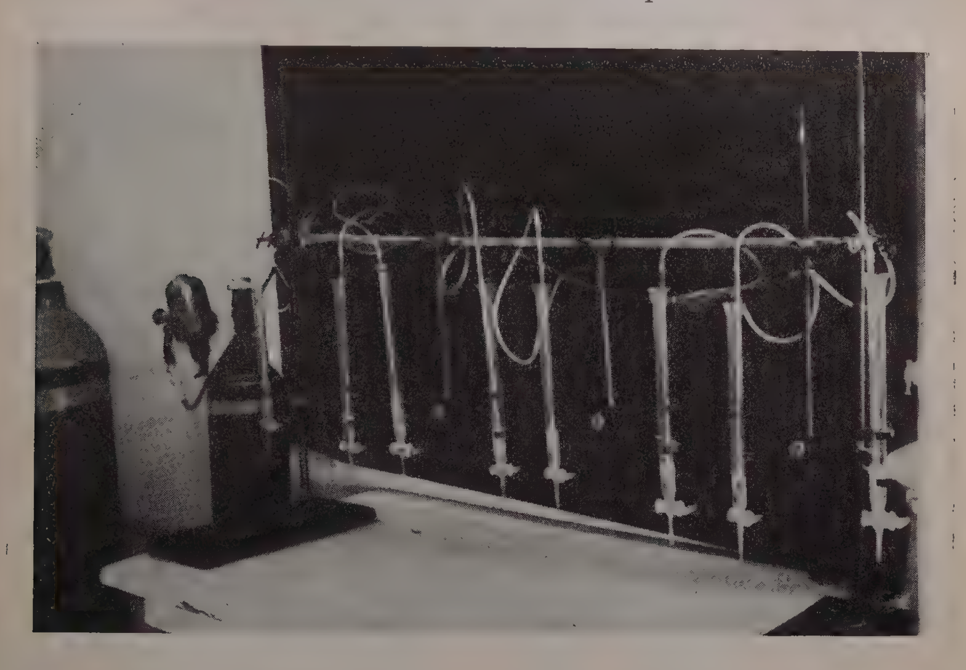
SO_4H_2 : environ N.

Chlorure stanneux : 10 g dans 25 ml HCl concentré. Conserver à l'abri de la lumière et à basse température (conservation deux mois).

2. — Appareillage.

Nous utilisons des burettes à robinet, non graduées, de 15 mm de diamètre intérieur et environ 25 cm de longueur.

Le mélange des couches se fait par barbotage de gaz inerte (CO_2 ou N_2) ; les résultats sont moins bons avec l'air comprimé.



3. — Mode opératoire.

La prise d'essai est introduite dans la burette et amenée à 5 ml (avec les eaux de lavage des fioles ou tubes à essai si cela est nécessaire).

Les réactifs sont introduits dans l'ordre : (pour 5 ml de prise d'essai) :

0,4 ml $SO_4H_2$10N.

1 ml de solution molybdate.

3 ml d'alcool isobutylique.

Faire barboter le gaz 3 minutes pour bien mélanger les deux couches. Laisser décanter environ 1 minute. Le complexe phosphomolybdique est beaucoup plus soluble dans la couche alcoolique. Pour les faibles quantités de Pm (couche alcoolique incolore ou à peine teintée en jaune) l'extraction est pratiquement totale. Si la couche alcoolique est fortement teintée en jaune, il est préférable d'ajouter quelques ml d'alcool isobutylique et de refaire le barbotage 3 minutes.

Décanter la couche aqueuse.

Laver la couche alcoolique par barbotage de gaz deux fois avec 1 ml chaque fois de SO_4H_2N. Si l'on a augmenté la quantité d'alcool isobu-

tylique, augmenter proportionnellement la quantité d'acide sulfurique de lavage.

Décanter la couche aqueuse au maximum.

Recueillir le liquide alcoolique dans une fiole jaugée : 3, 5, 10 ml ou plus selon la coloration du liquide. Rincer la burette avec de l'alcool éthylique et recueillir l'alcool de rinçage dans la fiole jaugée. Amener à volume connu avec l'alcool éthylique.

Une série de fioles contenant des quantités connues de phosphore est préparée de la même manière.

A ce stade, les fioles peuvent être conservées plusieurs jours à l'abri de la lumière.

La coloration est obtenue par addition à chaque fiole de 0,1 ml de solution de chlorure stanneux par 10 ml de solution alcoolique.

La couleur se développe instantanément, est stable pendant environ 30 minutes. Elle est bleu-violet avec maximum d'absorption à 730 mμ. Après 30 minutes, elle vire au bleu-vert et présente deux maxima à 625 et 730 mμ (fig. 1) ; le maxima à 730 mμ de la couleur bleu-violet est augmenté quand il y a passage au bleu-vert.

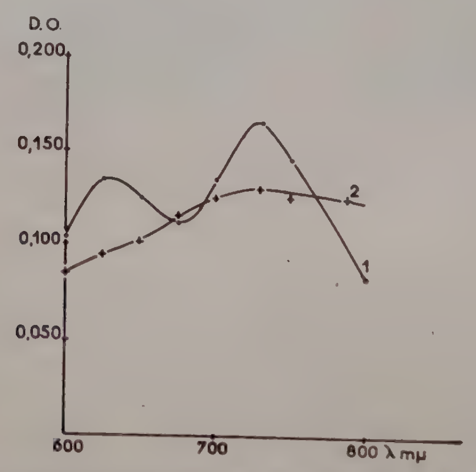


FIG. 1. – Spectre d'absorption du composé bleu, en fonction de l'acidité. 2,5 γ Pm pour 10 cm³ de solution alcoolique. — Lecture après 20 min. (1) : 0,05 ml Cl_2Sn. — (2) : 0,1 ml Cl_2Sn.

La colorimétrie ne doit être faite que sur les solutions ayant la couleur bleu-violet avec un seul maximum à 730 mμ. Dans ces conditions, la loi de BEER est suivie. Quand la couleur est bleu-vert, il n'y a plus proportionnalité ni à 625 mμ ni à 730 mμ entre la densité optique et la concentration en Pm.

Il est absolument essentiel de respecter la proportion de 0,1 ml de Cl_2 Sn pour 10 ml de solution alcoolique. Avec des quantités moindres

de Cl_2Sn, le passage du bleu-violet au bleu-vert est très rapide, parfois immédiat. Il est accéléré également si l'alcool éthylique n'a pas été soigneusement redistillé sur potasse.

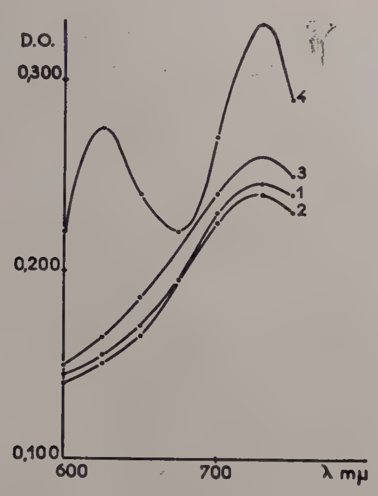


FIG. 2. — Spectre d'absorption du composé bleu, en fonction du temps : 5 γ Pm pour 10 cm³ de solution alcoolique. (1) initial. — (2) après 30 mn. — (3) après 45 mn. — (4) après 60 mn.

4. — Résultats.

Les tableaux I, II, III et les figures 1 et 2 résultent de l'étude de quelques facteurs sur la valeur des densités optiques et du spectre d'absorption du composé bleu.

La méthode indiquée permet de doser avec une assez bonne précision (moins que 5 p. 100) des quantités de phosphore variant de 0,2 à 50 γ.

TABLEAU I

Influence de la concentration de SO_4H_2.

P_m : 5γ ; isobutanol : 3 ml ; volume total : 10 ml ; molybdate : 1 ml.

Volume de la prise d'essai. :	ml de SO_4H_2 10 N	D. O. par rapport à l'alcool éthylique 730 mμ
5ml	0,1	270
	0,2	272
	0,4	270
	0,6	270
	1,0	45
10ml	0,2	270
	0,4	262
	1,0	136
	1,5	45
	2,0	30

La densité optique observée au Beckmann B, cellule de 1 cm d'épaisseur, est de 0,05 pour une concentration de 1 γ de phosphore dans 10 ml de solution.

TABLEAU II

Influence de la quantité d'isobutanol.

Volume prise d'essai : 5 ml ; P_m : 5γ ; SO_4H_2 10 N : 0,4 ml ; molybdate : 1ml.

Volume (isobutanol) en ml	D. O. par rapport à l'alcool isobutylique
1	pas de démixion
2	250
3	260
5	270

TABLEAU III

P_m en γ	Volume de la solution alcoolique	D. O. × 10^{-3} à 730 m	D. O. × 10^{-3} pour 1 dans 10ml
0,1	3 ml	25	75
0,2	«	35	52,5
0,4	«	67	50,5
0,6	«	105	52,5
0,8	«	130	49,0
1	«	170	51
5	10 ml	260	52
10	«	510	51
15	«	770	51,3
20	«	1 030	51,5
30	50 ml	290	48,5
40	«	385	48
50	«	495	49,5

II. — DOSAGE DU PHOSPHORE TOTAL

La minéralisation des échantillons est faite dans des matras de 30 ml. La prise d'essai liquide est d'abord évaporée, après addition de 0,4 ml de $SO_4H_2$10N, dans une étuve réglée à 180°, jusqu'à noircissement du contenu du matras. 1 ou 2 gouttes d'eau oxygénée pure à 110 volumes sont ajoutées après refroidissement et le matras remis à l'étuve. Le contenu doit se décolorer après 30 minutes, sinon l'addition d'eau oxygénée est renouvelée. Dans ces conditions, il ne se forme pas de pyrophosphates. L'eau oxygénée doit être complètement détruite, sinon elle donne avec le molybdate d'ammonium un composé jaune qui perturbe la formation du composé phophomolybdique.

Après refroidissement, le contenu du matras est amené à volume connu. En général, nous ajoutons 10 ml d'eau, ce qui donne un volume total de 10,4 ml, compte tenu de l'acide sulfurique de minéralisation.

Une partie aliquote est prélevée et transvasée dans la burette comme pour un dosage de phosphore minéral. Nous calculons la quantité d'acide sulfurique 10N ainsi introduite et la défalquons des 0,4 ml nécessaires pour 5 ml de solution.

Nous avons toujours effectué un dosage à blanc avec les divers réactifs. En général, la densité optique de ce « blanc » mesurée par rapport à l'alcool, donne une coloration qui correspondrait à une quantité de 0,05 à 0,15 γ de P.

III. — DOSAGE DU PHOSPHORE HYDROLYSABLE

L'hydrolyse se fait avec l'acide chlorhydrique pour que la concentration finale soit N. Après un temps variable d'hydrolyse à température voulue, nous neutralisons avec une soude concentrée de titre connu et le liquide résultant est traité comme pour le dosage du phosphore minéral.

IV. — FRACTIONNEMENT DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS

Les composés phosphorylés absorbés sur une colonne de résine anionique sont élués par des solutions dont la force ionique, le pH et la concentration en acide varient. Les oses monophosphates peuvent être séparés soit en groupe, soit individuellement, des composés di ou triphosphates.

Les composés phosphorés sont déterminés par un dosage de phosphore minéral, hydrolysable ou total ; par mesure de la densité optique dans l'ultraviolet, ou par dosage spécifique des sucres : hexoses à l'anthrone, pentoses avec la réaction à l'orcinol, fructose par la méthode de Roe.

Matériel.

La colonne d'échangeur d'anions est contenue dans une burette à robinet de 8 mm de diamètre intérieur. Celle-ci est remplie sur une hauteur de 20 mm à l'aide d'une suspension de Dowex 1 × 8 200-400 mesh, préalablement débarrassée des particules fines par décantation, puis activée par lavage avec HCl 2N, pour la transformer sous la forme chlorure. La colonne est lavée à l'eau distillée pour éliminer l'excès d'acide chlorhydrique. Les solutions d'élution sont placées dans un réservoir à une hauteur telle que la colonne débite environ 1 ml par minute. Les fractions de 5 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur.

Mode opératoire.

1° La solution des composés phosphorés, débarrassée des cations minéraux, est amenée à pH = 8,5 avec de l'ammoniaque diluée. Sa concentration en sels doit être inférieure à M/100, sinon certains composés ne sont pas fixés.

Elle est introduite sur la colonne, adsorbée et la colonne est lavée avec 50 cc de NH_4OH M/1000. De cette manière, tous les composés de caractère neutre ou basique sont élués. Après passage de 40 cc de NH_4OH M/1000, il ne doit plus y avoir absorption dans l'ultra-violet (240 à 280 mμ) ni réaction des sucres à l'anthrone. Dans le cas contraire, il est nécessaire de prolonger le lavage avec NH_4OH M/1000 et de vérifier l'absorption totale des composés phosphorés.

Après défécation perchlorique de certains extraits biologiques riches en protéines (broyats cellulaires, mitochondries, etc.) l'élimination də l'acide perchlorique par la potasse n'est parfois pas suffisamment complète et la concentration des sels restants après neutralisation par l'ammoniaque est trop grande : la fixation n'est pas totale et une partie des hexoses phosphates, du phosphore minéral est éluée avec NH_4OH M/1000. Il faut alors refaire une colonne et diluer la solution des composés phosphorés.

2° Elution.

a) Phosphore minéral et glucose-1-PO_4.

La colonne est lavée avec 150 ml de solution 0,025 M en chlorure d'ammonium et 0,01 M en borate de sodium ou potassium.

b) Oses monophosphates.

La colonne est lavée avec 80 ml $ClNH_4$, 0,03M. Une seule fraction est éluée, correspondant au mélange G6P, F6P dans nos essais. Il est vraisemblable que les composés formés par photosynthèse et décrits par Benson et Calvin : Sed P, MP, R5P se trouvent également dans cette fraction.

Khym et Cohn séparent G6P, F6P et R5P en variant la concentration en borate. L'ordre d'élution est :

G_6P avec 0,0025 M $ClNH_4$,	0,0025 M NH_4OH	et	0,001	M $B_4O_7K_2$
F_6P avec 0,025 M $ClNH_4$,	0,0025 M NH_4OH	et	0,00001	M $B_4O_7K_2$
R_5P avec 0,03 M $ClNH_4$.				

Goodman, Benson et Calvin avec une colonne de Dowex 1 (28 × 0,8) cm, dans une forme borate, séparent en éluant avec $B_4O_7Na_2$ 0,1M : GIP, la somme (F6P + Sed P + MP) et G6P.

Nous n'avons pas cherché de séparation dans ce groupe puisqu'il est possible d'obtenir d'assez bonnes séparations par rechromatographie sur papier de ces composés, selon les méthodes du laboratoire CALVIN ou par la méthode d'AXELROD et BANDURSKI.

c) *Adenosine monophosphate.*

La colonne est lavée avec 30 ml de HCl 0,005M. L'AMP sort très rapidement en 3 ou 4 fractions. On suit la densité optique à 257 mμ (à pH : 2).

d) *Phosphoglycerate et adenosine diphosphate.*

La colonne est lavée avec 150 ml HCl 0,01M. GPA sort d'abord avec un maximum étalé puis, avant qu'il soit complètement élué, ADP sort également avec un maximum étalé. Le dosage de ces deux composés se fait par mesure du phosphore total et de la densité optique à 257 mμ.

Si l'acide phosphoglycolique est présent, il peut se superposer à l'ADP et même avec l'hexose diphosphate.

e) *Hexose diphosphate.*

La colonne est lavée avec 80 ml de 0,02 MHCl, 0,02MKCl. Cette fraction peut contenir également un peu d'ADP, P-glycolique, ainsi que RDP. Il peut être utile d'éluer cette fraction avec un volume supérieur de solution.

f) *Adenosine triphosphate.*

La colonne est lavée avec 50 cc de 0,02MHCl, 0,2MKCl. Tout l'ATP sort pratiquement dans les 20 premiers ml. La densité optique à 257 mμ permet de différencier l'ATP et d'autres composés polyphosphorés.

g) *Polyphosphates.*

La colonne est lavée avec HClN, les fractions recueillies peuvent contenir divers composés phosphorés dont les principaux sont des phosphates minéraux condensés du type polyphosphates. Ils ont été signalés dans les algues, la levure. Leurs séparations s'effectuent par les méthodes décrites par EBEL.

Dosage.

1° *Densité optique.*

Les tubes des fractions NH_4OH, 3,4, 5,6, sont passés au Beckman DU à 257 mμ. Il est utile de mesurer également la densité optique à

240, 250, 260, 280 et 300 mμ, ce qui permet de déceler dans les fractions 3, 4, 5, 6 d'autres nucléotides. Les recherches de COHN, de LEHNINGER, de CALVIN montrent qu'il existe toute une série de nucléotides dans les tissus animaux et végétaux dont les bases (Cytosine, Uracile, Adenine, Guanine) absorbent à des longueurs d'onde comprises entre 240 et 280 mμ. Les composés mono, di et triphosphatés des ribosides de ces bases se comportent sensiblement de la même manière que les adenosines mono, di et triphosphates. La séparation de ces constituants s'effectue de préférence après adsorption sur Dowex 1 sous forme formate, par élution avec des solutions contenant des concentrations croissantes d'acide formique et de formiate d'ammonium.

La densité optique permet de calculer la concentration des dérivés phosphorés de l'adenosine :

	ε μ M × 10^{-3} à 260 m	
pH	2	7
ATP	14,3	15,4
ADP	14,5	15,4
AMP	14,6	15,4

2° *Phosphore.*

Sur les fractions séparées, nous dosons le phosphore total. Les fractions recueillies sont de 5 ml, nous minéralisons une partie aliquote soit tube par tube, soit en mélangeant les parties aliquotes de plusieurs tubes (généralement 2 ou 3).

Le phosphore minéral est dosé sur une partie aliquote des tubes correspondant à l'élution avec le mélange 2 (borate, chlorure d'ammonium). Après minéralisation d'une partie aliquote de ces mêmes tubes, le dosage du phosphore donne la somme de P_m et de P du GIP.

Le phosphore total du fractionnement 3 se compose du P du PGA et du P de l'ADP. Ce dernier est calculé à partir de la densité optique.

3° *Sucres.*

Les méthodes de dosage des sucres ne permettent pas de déterminer moins de 5 γ de fructose par la méthode de ROE modifiée (HERS), 1 γ de pentose par la méthode à l'orcinol et 20 γ des hexoses par la méthode à l'anthrone. Leur sensibilité n'est pas aussi grande que celle du dosage du phosphore et la détermination ne peut se faire que dans les tubes où le dosage du phosphore indique la présence d'une quantité suffisante de sucres.

Résultats.

La figure 3 montre un fractionnement opéré sur une solution de composés phosphorés en quantités connues.

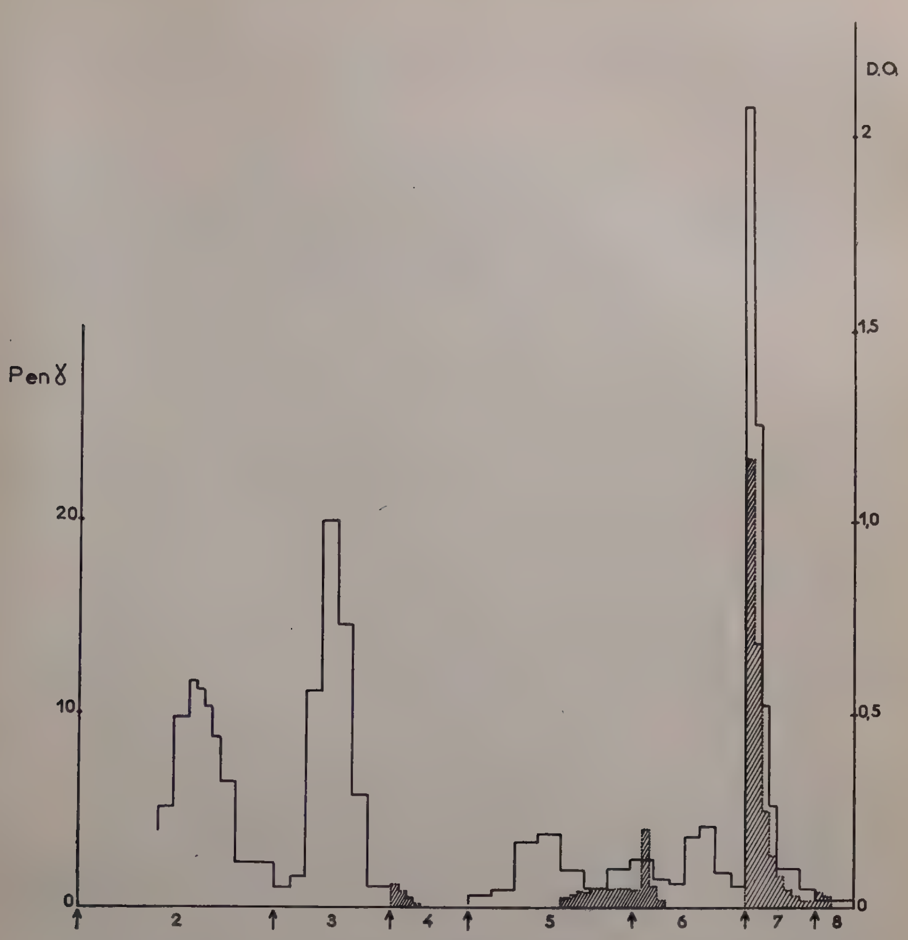


FIG. 3. — Fractionnement d'un mélange de composés phosphorés. Les solutions d'élution sont : (2) $ClNH_4$: 0,025 M ; $B_4O_7Na_2$: 0,01 M. — (3) $ClNH_4$: 0,03 M. — (4) HCl : 0,005 M. — (5) HCl : 0,01 M. — (6) HCl : 0,02 M ; KCl : 0,02 M. — (7) HCl : 0,02 M. KCl : 0,2 M. — (8) HCl : M. — Courbe en trait plein : Phosphore total. — Courbe en pointillé : D.O. à 260 mμ.

Le tableau IV montre la concordance entre les résultats obtenus et la composition de la solution.

TABLEAU IV

	Ajouté	Trouvé
Pm	12	96 (Pm + GIP)
GIP	80	
F6P	72	111 (F6P + G6P)
G6P	55	
GPA	28,5	29,5
HDP	24,5	24,5
Adenosine phosphate	124	
AMP		traces
ADP		22,0
ATP		91,5
Polyphosphates (?)		5,0
Phosphore total	396	369,5

Dans un autre essai, pour 1.280 γ de P minéral, ajoutés sur la colonne, nous avons recueilli dans la fraction borate 1208 γ répartis en 16 tubes de 5 ml.

DISCUSSION.

Cette méthode permet de séparer dans un mélange divers composés ou groupes de composés phosphorés. La précision de chaque détermination est variable, et l'erreur peut être supérieure à 10 p. 100, mais la

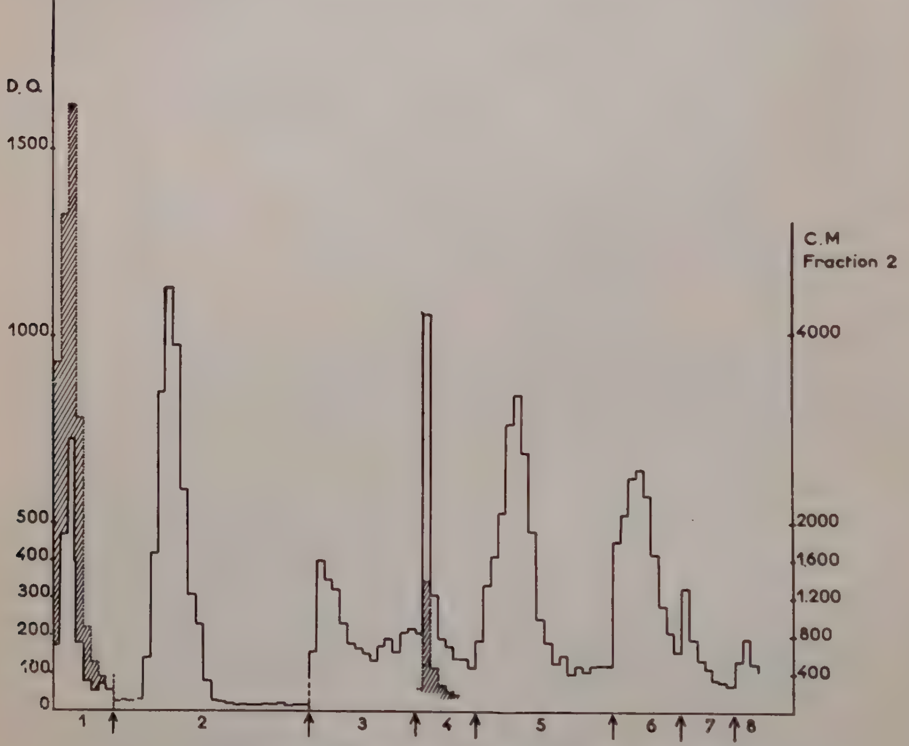


FIG. 4. — Fractionnement d'un extrait de feuille de Tabac ayant absorbé P_{32}. (1) NH_4OH : 0,001 M. — Le reste, comme pour légende fig. 3.

sensibilité de la méthode permet de travailler avec de petites quantités de végétaux (1 à 5 g frais). Les résultats décrits dans le tableau IV et le graphique 3 ont été obtenus en analysant seulement 2 ml sur 5 ml de chacun des tubes du collecteur de fraction. Il serait possible d'analyser la totalité du contenu des tubes, si les composés sont repérés par un autre moyen, par exemple, par la mesure de densité optique ou de la radioactivité.

Nous l'avons utilisée pour diverses analyses. Le graphique 4 montre la répartition de la radioactivité et de la densité optique à 260 mμ après

fractionnement d'un extrait acidosoluble de feuilles de Tabac, alimenté pendant 2h, avec du P^{32}. Seul le phosphore total et minéral introduit sur la colonne était connu : 210 γ et 150 γ.

Il est intéressant de noter que dans la fraction 1 correspondant à la fixation sur la colonne et au lavage de l'excès des substances neutres par NH_4OH M/1000, nous observons une radioactivité non négligeable ; sensiblement proportionnelle à la densité optique à 260 mμ. Il semble donc que certains composés phosphorés ne sont pas absorbés. Cela correspond à des corps amphotères à prédominance de fonctions basiques. Ils sont assez rapidement marqués par le P^{32}, ce qui indique que leur métabolisme doit être actif. Peut-être s'agit-il des précurseurs des acides nucléiques (eu égard à l'absorption à 260 mμ). Ils représentent 10,3 p. 100 de la radioactivité du P organique et l'activité spécifique est environ 120 c/m pour une densité optique de 1.

La fraction 2 correspond au P minéral, soit 53,5 p. 100 de la radioactivité totale.

La fraction 3 est un mélange qui contient vraisemblablement F6P et G6P d'après l'allure de la courbe d'élution, mais également d'autres composés comme l'indique l'augmentation de la radioactivité dans les derniers tubes de cette fraction. En tout, 19,6 p. 100 de la radioactivité du P organique.

La fraction 4 est de l'adénosine monophosphate sensiblement pur ; la courbe d'absorption a un maximum très net à 257 mμ à pH = 2,0 et l'activité spécifique 1000 c/m pour une densité optique de 1, est constante pour les 4 premiers tubes où pratiquement l'AMP se trouve rassemblé.

Il est particulièrement intéressant de noter qu'après 2 heures de contact le P^{32} est intégré dans l'AMP. Cela indique une réelle synthèse de ce composé alors que la phosphorylation oxydative ne marquerait que le 2e P de l'ADP ou le 2e et 3e P de l'ATP. Il n'y a d'ailleurs dans le fractionnement pas de quantités décelables (par la densité optique) d'ADP (fraction 5) ou d'ATP (fraction 7). Il est vraisemblable que ces composés ont été hydrolysés pendant la préparation de l'extrait et que l'AMP observé est la somme AMP, ADP et ATP, ce qui représente 13,2 p. 100 de la radioactivité du P organique.

La fraction 5 contient PG, d'après l'allure de la courbe d'élution et représente 31,5 p. 100 de la radioactivité du phosphore organique.

La fraction 6 contient les esters diphosphates et peut-être du phosphoglycolate. Les esters diphosphates comprennent l'hexodiphosphate et surtout le ribulose diphosphate. La radioactivité représente, avec celle de la fraction 7 qui ne contient pas d'ATP, mais vraisemblablement le reste de la fraction 6, 27 p. 100 de la radioactivité du phosphore organique.

Les résultats de ce fractionnement montrent le marquage des différents composés acido-solubles après 2 h de contact avec P^{32}.

Ce fractionnement a duré environ 10 h et les comptages et détermination de densité optique 2 jours. Il illustre assez bien les possibilités de la méthode utilisée : séparation assez nette de diverses fractions pour la connaissance exacte desquelles il est nécessaire de faire appel à d'autres méthodes (chromatographie sur papier, analyse chimique ou physico-chimique). Quand, pour un matériel biologique donné, la composition des diverses fractions est connue, il est relativement aisé de suivre la cinétique des transformations de certains composés. Nous avons pu étudier de cette manière la phosphorylation oxydative de mitochondries de pois, de mitochondries de foie en présence ou absence d'inhibiteur. Ces recherches seront l'objet d'un autre article.

RÉSUMÉ

Par chromatographie de partage sur échangeur d'anions, nous avons pu séparer de très faibles quantités de composés phosphorés. Cette méthode permet d'étudier les composés phosphorés acido-solubles formés dans divers métabolismes. Un exemple est donné, d'une étude des composés phosphorés acido-solubles formés après introduction de P^{32} dans des feuilles de tabac.

SUMMARY

By adsorption chromatography using an anion exchanger, very small amounts of phosphorus compounds were separated. The method is suitable for the study of acid-soluble phosphorus compounds formed during various metabolic processes. An example is given of a study of acid-soluble phosphorus compounds formed after introduction of P^{32} in tobacco leavers.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Trennungschromatographie auf Anionenumtauscher konnte man ganz geringe Mengen phosphorhaltigen Stoffe trennen. Dieses Verfahren erlaubte es die säurelöslichen phosphorhaltigen Stoffe, die sich bei verschiedenen Stoffwechseln bilden, zu untersuchen. Man gibt ein Beispiel einer Untersuchung der säurelöslichen phosphorhaltigen Stoffe, die sich nach Einspritzen von P^{32} in Tabakblätter gebildet haben.

РЕЗЮМЕ

Г. ДЮСЭ й И. МЕНКЛЬ. (Центральная станция Физиологии растений, Версаль.)

Хроматографией разделения на обменятелях анионов, нам удалось отделить очень слабые количества фосфорных соединений. Этот метод позволяет изучать растворимые в кислотах фосфорные соединения, образовавшиеся в различных метаболизмах (= превращениях молекул в развивающихся растениях). Дан пример изучения растворимых в кислотах фосфорных соединений образовавшихся после введения в листья табака изотопа P_{32}.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BANDURSKI (R. S.) et AXELROD (B.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 405.
(2) BENSON (A. A.) in Modern methods of Plant Analysis vol. II, 1955, p. 113 (Springer Verlag).
(3) BERENBLUM (I.) et CHAIN (E.). — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 286-295.
(4) EBEL (J. P.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1953, 991.
(5) GOODMAN (M.), BENSON (A. A.) et CALVIN (M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 4257.
(6) KHYM (J. X.) et COHN (W. E.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 1153.
(7) ZINZADZE (C. H.). — *Annales Agron.*, 1931, **1**, 321.
(8) ZELLER. — *Hel. Chim. Acta.*, 1954.

VARIATIONS DES PIGMENTS FOLIAIRES EN FONCTION DE LA CARENCE EN AZOTE ET DU VIEILLISSEMENT CHEZ LE TABAC

PAR

Cl. COSTES et Y. COÏC
Station centrale de Physiologie végétale, Versailles.

Dans ce travail, nous avons examiné la variation chez le Tabac de la concentration de divers pigments foliaires lors du vieillissement ainsi que sous l'influence d'une déficience de nutrition azotée.

Étaient déterminés : la chlorophylle totale, la chlorophylle a, la chlorophylle b, l'ensemble des carotènes et l'ensemble des xanthophylles.

Les Tabacs étaient cultivés en pots sur sable de quartz pur, et étaient alimentés par une solution nutritive contenant, pour 10 litre d'eau distillée :

$(NO_3)_2Ca$, $4H_2O$	7,6 g
NO_3K	3,24 g
PO_4H_2Na, H_2O	1,54 g
SO_4Mg, $7H_2O$	3,68 g
Versenate de Fe : Fe	0,056 g
SO_4Mn, H_2O	0,169 g
SO_4Cu, $5H_2O$	0,0025 g
SO_4Zn, $7H_2O$	0,0029 g
BO_3H_3	0,0186 g
$MoO_{24}(NH_4)_6$, $4H_2O$	0,00035 g

A partir d'une certaine date (27 septembre), 2 lots, I et II, continuent à être alimentés par la même solution nutritive, tandis que le lot III est alimenté par une solution sans azote, les nitrates de potassium et de chaux étant remplacés par :

	pour 10 l. d'eau
Cl_2Ca, $10H_2O$	0,142 g
PO_4H_2K	1,51 g

Le 27 septembre, un prélèvement a été fait sur le lot I et a donné lieu aux dosages « témoins ». Après dix-neuf jours, un prélèvement sur le lot III, a permis d'étudier l'effet de la carence en azote, et un prélèvement sur le lot II a permis de voir, parallèlement, l'action du vieillissement. A chaque fois, les prélèvements ont été effectués à la même heure de la journée : 11 h 45.

Échantillonnage.

Pour les 3 lots, les prélèvements ont porté sur des feuilles de même âge et ils ont donné naissance à 2 échantillons chacun, de la manière suivante :

Deux rondelles, d'un diamètre de 20 mm, sont découpées avec un emporte-pièce, de chaque côté de la nervure centrale. Pour chaque lot, les 6 rondelles correspondant à la partie droite de la feuille constituent un échantillon, les 6 rondelles de la partie gauche constituent un second échantillon. On arrive ainsi à obtenir des échantillons homogènes.

La masse de matière fraîche de chaque échantillon est comprise entre 0,30 g et 0,40 g, pour une surface foliaire constante de 18,8 cm^2.

Extraction et séparation des pigments.

L'échantillon, après passage 10 minutes au congélateur, est broyé dans un mortier en présence de sable, de carbonate de calcium et d'acétone. Tous les pigments envisagés ici passent en solution dans l'acétone. Après filtration, on amène à 50 ml avec de l'acétone. Cette solution acétonique est divisée en deux parties :

— Sur 25 ml, les pigments sont extraits complètement par 25 ml d'éther éthylique. Sur cette solution, on dose la chlorophylle totale, la chlorophylle a, et la chlorophylle b.

— Sur 25 ml on sépare les caroténoïdes (1).

Après saponification, pendant 15 heures, par 15 ml de potasse à 15 p. 100 dans le méthanol, on extrait les caroténoïdes par 10 à 15 ml d'une solution contenant de l'éther de pétrole et de l'éther éthylique, volume pour volume. Les xanthophylles sont séparées des caroténoïdes par chromatographie sur colonne. L'adsorbant est constitué par un mélange à poids égaux de magnésie et de célite (Clearcel) dans une colonne de 11 mm × 80 mm. Les carotènes passent à travers la colonne et celle-ci est lavée par un mélange d'éther de pétrole (2 vol.) et d'éther éthylique (1 vol.). Les carotènes sont repris dans l'hexane et étendus à 10 ml. Les xanthophylles, éluées par un mélange d'éther éthylique (2 vol.) et d'éthanol (1 vol.) sont reprises dans l'éther de pétrole et étendues à 10 ml.

Dosages.

Les pigments sont dosés en solution au spectrophotomètre Beckman.

Chlorophylles dans l'éther : on mesure les densités optiques à 6 425 Å et à 6 600 Å. (2) (COMAR et ZSCHEILE).

en mg/l	
Chlorophylle totale	$7{,}12 D_{6600} + 16{,}8 D_{6425}$
Chlorophylle *a*	$9{,}93 D_{6600} - 0{,}777 D_{6425}$
Chlorophylle *b*	$17{,}6 D_{6425} - 2{,}81 D_{6600}$

Carotènes dans l'hexane : ils sont dosés globalement à 4 510 Å, maximum d'absorption du β carotène dans l'hexane. A ce maximum, $E\left\{\begin{matrix}1\text{ p. }100\\1\text{ cm}\end{matrix}\right. = 2\,560$ (3). Si *m* est la masse de matière fraîche de l'échantillon en mg :

$$\text{Carotènes } {}^0/_{00} = \frac{20D_{4510}}{256\text{ m}} \times 1\,000.$$

Xanthophylles dans l'éther de pétrole : elles sont dosées globalement à 4 450 Å, longueur d'onde pour laquelle $E\left\{\begin{matrix}1\text{ p. }100\\1\text{ cm}\end{matrix}\right. = 2\,500$ (4).

$$\text{Xanthophylles } {}^0/_{00} = \frac{2D_{4450}}{25\text{ m}} \times 1\,000.$$

Résultats.

Les résultats sont portés en p. 1 000 de matière fraîche sur le diagramme I. L'examen de ce diagramme montre une diminution de la

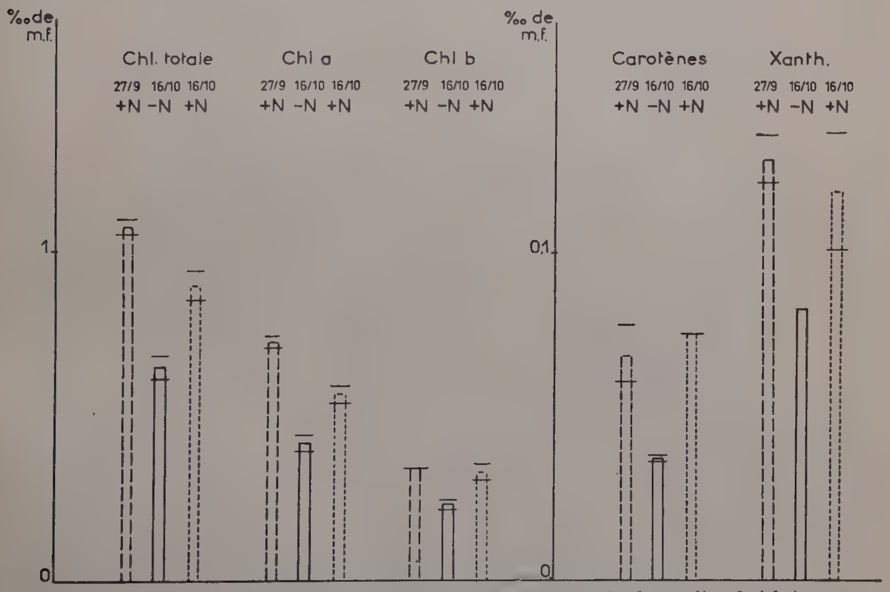


Fig. 1. — Teneurs en pigments foliaires (exprimées en ‰ de matière fraiche).

teneur de tous les pigments, diminution plus accentuée lorsqu'il y a carence en azote que si le vieillissement agit seul.

En faisant les rapports des concentrations d'un pigment pour :

$$\frac{\text{prélèvement carencé en azote}}{\text{prélèvement témoin}} \text{ puis pour } \frac{\text{prélèvement “ vieilli ”}}{\text{prélèvement témoin}},$$

on arrive à mettre en évidence :

— les effets conjugués du vieillissement et de la carence en azote par le premier rapport ;

— l'effet du vieillissement seul par le second rapport.

Enfin, la comparaison des différents rapports $\frac{\text{chlorophyle a}}{\text{chlorophyle b}}$ et $\frac{\text{xanthophylles}}{\text{carotènes}}$ permet de préciser l'aspect des variations relatives.

Les tableaux ci-dessous résument les résultats :

	Témoin	Vieillissement	Carence en azote et vieillissement
	—	—	—
$\frac{\text{Chl.}}{\text{Chl. témoin}}$	1	0,83	0,6
$\frac{\text{Chl. a}}{\text{Chl. a témoin}}$	1	0,78	0,58
$\frac{\text{Chl. b}}{\text{Chl. b témoin}}$	1	0,96	0,67
$\frac{\text{Carotènes}}{\text{Car. témoin}}$	1	1,09	0,54
$\frac{\text{Xanthophylles}}{\text{Xanth. témoins}}$	1	0,92	0,64
$\frac{\text{Chl. a}}{\text{Chl. b}}$	2,1	1,70	1,82
$\frac{\text{Xanthophylles}}{\text{Carotènes}}$	1,86	1,57	2,21

Les pertes en pigments pendant 19 jours, exprimés en p. 100, et imputables à la seule carence en azote et au seul vieillissement se distribuent ainsi :

	Carence en azote	Vieillissement
	—	—
Chlorophylle........	— 23	— 17
Chlorophylle *a*......	— 20	— 22
Chlorophylle *b*......	— 29	— 4
Carotènes	— 55	+ 9
Xanrhophylles......	— 28	— 8

Le vieillissement provoque une diminution du rapport Chl a/Chl b, due à une baisse du taux de chlorophylle a, la chlorophylle b n'étant pratiquement pas atteinte (— 4 p. 100). (Dans des conditions expérimentales très différentes, F. T.. Wolf a trouvé des résultats analogues concernant les variations des chlorophylles a et b dans les feuilles automnales de divers arbres) (5). Les carotènes et les xanthophylles ne semblent pas varier significativement lors du vieillissement : il y a peut-être cependant une légère augmentation du taux des carotènes, celui des xanthophylles baissant légèrement.

La carence en azote a des effets plus spectaculaires. Il y a une baisse du taux de chlorphylle b (— 29 p. 100), accompagnée d'une baisse moindre du taux de chlorophylle a (— 20 p. 100). Mais le phénomène le plus important est la chute nette de la teneur en carotènes totaux, et une

chute moins accentuée des xanthophylles, ce qui entraîne une augmentation du rapport xanth./carot. Toutes ces variations se traduisent par un pâlissement de la feuille : c'est le symptôme apparent de la carence en azote, à son début.

Discussion.

Les pigments de la feuille subissent un renouvellement incessant comme l'indiquent, par exemple, les variations diurnes de la chlorophylle et du rapport $\frac{\text{chlorophylle a}}{\text{chlorophylle b}}$ (1).

On conçoit bien qu'en état de déficience en azote, le renouvellement des chlorophylles, substances azotées, soit diminué, le manque d'azote limitant les resynthèses.

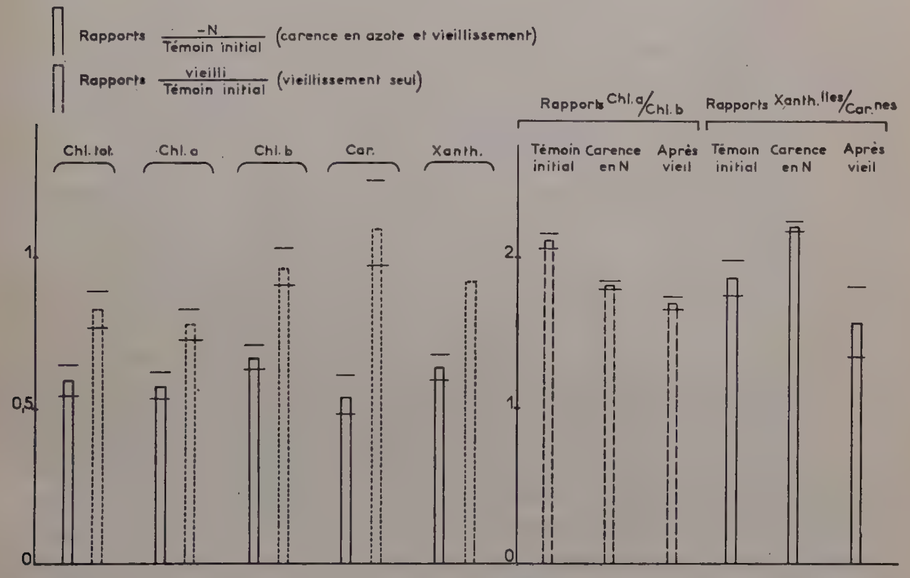


FIG. 2. — Action de la carence en azote et du vieillissement sur les teneurs en pigments.

Quant aux caroténoïdes, dont les molécules ne renferment pas d'azote, ce sont eux qui sont paradoxalement les plus touchés. Il n'est pas impossible que certaines substances azotées (précurseur, enzyme...) interviennent dans leur synthèse, mais bien des faits nous amènent à penser que ce serait leur liaison avec des protéines chloroplastiques qui influerait profondément sur leur métabolisme. La carence en azote, limitant la resynthèse des protéines, agirait indirectement sur la teneur en caroténoïdes ; ce mécanisme jouant aussi vraisemblablement dans l'abaissement de la teneur en chlorophylles.

Examinons l'action comparée du « vieillissement » et de la carence

en azote à la lumière de ce que l'on pense du rôle des pigments dans la photosynthèse.

On pense actuellement que l'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse est absorbée :

1° Directement par la chlorophylle a, photorécepteur principal.

2° Par les carotènes et la chlorophylle b, qui transmettent ensuite cette énergie à la chlorophylle a. (6), (7), (8).

L'ensemble de ces pigments serait fixé à des protéines. Dans ce schéma, les caroténoïdes et la chlorophylle b ne jouent qu'un rôle d'intermédiaires accessoires.

Le vieillissement d'un végétal chlorophyllien semble donc être caractérisé par la disparition progressive du photorécepteur principal (chlorophylle a), tandis que le système photorécepteur intermédiaire (carotènes et chlorophylle b) reste à peu près inchangé, tout au moins pendant un certain temps.

Par contre, la déficience sévère en azote a eu pour effet d'amoindrir fortement le photorécepteur intermédiaire, particulièrement les caroténoïdes. Le photorécepteur principal (chlorophylle a) a aussi été atteint mais on peut dire qu'il a été relativement peu amoindri par rapport au photorécepteur intermédiaire. (Il faut souligner que la carence en azote était aiguë, puisque la solution nutritive était dépourvue d'azote après le prélèvement témoin, ce qui a eu pour effet de diminuer très fortement la croissance du Tabac carencé par rapport à celui alimenté normalement en azote).

On attribue aussi à des caroténoïdes un rôle dans le transport d'oxygène. Il y aurait (9) un système principal.

Zéaxanthine → anthéraxanthine → lutéine ; et un système secondaire β carotène → β carotène monoépoxyde → α carotène fonctionnant activement avec le premier système lorsque la photosynthèse est active. Dans le cas de carence en azote, on trouve que corrélativement à la diminution importante du matériel photosynthétique et de l'activité photosynthétique, il y a une diminution frappante du taux des substances intéressées au transport de l'oxygène résultant de la photosynthèse, les carotènes étant plus particulièrement touchés. On se rend compte, en l'occurence, de l'intérêt de l'analyse individuelle des substances du groupe des caroténoïdes.

Il serait évidemment souhaitable de répéter ce type de travail sur d'autres espèces végétales et aussi dans d'autres conditions de milieu (température, lumière, durée du jour) et de nutrition.

RÉSUMÉ

Chez le Tabac, le vieillissement se traduit par une baisse du rapport $\frac{\text{chlorophylle } a}{\text{chlorophylle } b}$ due à une baisse du taux de chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* étant peu atteinte. Les carotènes et xanthophylles varient peu (vraisemblablement : légère augmentation des carotènes et légère baisse des xanthophylles).

Par comparaison, la carence en azote se traduit par une forte diminution de la teneur des chlorophylles, la chlorophylle *b* étant la plus atteinte. Les xanthophylles subissent une baisse du même ordre de grandeur mais le taux de carotènes est tout particulièrement abaissé.

Ces résultats sont discutés à la lumière de ce que l'on pense actuellement du rôle des pigments étudiés, dans la photosynthèse.

SUMMARY

The maturing of tobacco is accompanied by a decrease in the ratio of chlorophyll a to chlorophyll b, due to a decrease in the concentration of the former while chlorophyll b is little affected. There is only a slight variation in carotenes and xanthophylls (probably a slight increase in the former and decrease in the latter).

On the other hand, nitrogen deficiency is associated with a marked decrease in the chlorophylls, chlorophyll b being the most affected. The xanthophylls decrease at a similar rate, but the decrease of carotenes is more marked.

The results are discussed in the light of present knowledge on the role of these pigments in photosynthesis.

РЕЗЮМЕ

И. КОИК и КОСТ. (Центральная станция Физиологии растений, Версаль.)

Наступление старости у табака сопровождается понижением отношения $\frac{\text{хлорофилл а}}{\text{хлорофилл б}}$, вызванным уменьшением содержания хлорофилла а, хлорофилл б будучи мало изменен. Каротены и ксантофиллы изменяются мало (по всей вероятности : небольшое увеличение каротенов и незначительное уменьшение ксантофиллов).

Сравнением установлено, что недостаточное питание азотом вызывает большое уменьшение содержания хлорофиллов, из них хлорофилл ·б изменен сильнее. Ксантофиллы уменьшаются приблизительно в такой же степени, но больше всего понижено содержание каротенов.

Эти результаты разсмотрены в свете современных представлений о роли изученных пигментов в фотосинтезе.

ZUSAMMENFASSUNG

Während des Veralten des Tabaks nimmt das *Chlorophyll a* Verhältnis ab und zwar wegen der Abnahme des Chlorophyll *a* Gehaltes Chlorophyll *b*, während das Chlorophyll *b* kaum beeinträchtigt wird. Die Karotine und die

Xanthophylle verändern sich wenig (wahrscheinlich : leichter Anstieg der Karotine und geringe Abnahme der Xanthophylle).

Vergleichsweise sinkt bei Stickstoffmangel der Chlorophyllgehalt sehr stark, dabei ist das Chlorophyll *a* am meisten beeinträchtigt. Die Xanthophyllabnahme steht im selben Grössenverhältnis, dagegen aber sinkt der Karotingehalt besonders stark.

Diese Ergebnisse wurden im Lichte des was man zur Zeit über Rolle der untersuchten Pigmente in der Photosynthese kennt, erörtert.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) KAY (R. E.) and PHINNEY (B.). — Plastid pigments changes in the early seedlings leaves of Zea Mays L. *Plant Physiology*, vol. **31**, nº 3, 1956, pp. 226-231.

(2) PAECH (K.), TRACEY (M. V.). — Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. — SMITH (J. H. C.) and BENITEZ (A.). — Chlorophylls : Analysis in plant material. vol. IV, pp. 143-196, p. 159.

(3) GOODWIN (T. W.). — Carotenoids. vol. III, p. 272-312, p. 294-296.

(4) GOODWIN (T. W.). — Carotenoids. Vol. III, p. 272-312, p. 308, 1955.

(5) WOLF (F. T.). — Changes in chlorophylls A and B in autumn leaves. *Am. J. of Botany*, vol. **43**, (1956), nº 9, p. 719.

(6) DUYSENS (L. N. M.). — Energy transformations in Photosynthesis. *Ann. Rev. of Plant Physiology*, vol. **7**, 1956, p. 25-50.

(7) BLINKS (L. R.). — The Photosynthetic function of Pigments others than chlorophyll. *Ann. Rev. of Plant Physiology*, nº 5, 1954, p. 92-114, p. 108.

(8) LIMRY (R.), SPIKES (J. D.) and EYRING (H.). — Photosynthesis, *Ann. Rev. of Plant Physiology*, nº 5, 1954, p. 270-340, (p. 293).

(9) CHOLNOKY (L.) et al. — Function of caroténoids in chlorophyll containing organs. *Nature*, vol. **178**, nº 4530, 1956, p. 410-11.

ÉTUDE SUR LES SYSTÈMES PROTÉINE-SEL-EAU : HYDRATATION DES PROTÉINES, SOLUBILITÉ, RELARGAGE, FRACTIONNEMENT

PAR

J. MOSSÉ

Station centrale de Physiologie Végétale, Versailles [1]

PLAN DU MÉMOIRE

[1] La plus grande partie de ce travail a été accomplie au laboratoire de Chimie Physique de l'Institut Pasteur, chez le Professeur D. DERVICHIAN à qui va toute notre gratitude.

INTRODUCTION

L'idée qui a présidé à ce travail, tout au moins dans ses débuts, a été d'envisager la précipitation des protéines par les sels en tant qu'équilibre de phases.

Une étude systématique des mélanges protéine-sel-eau prise sous un tel angle s'imposait depuis des années. Le succès et l'importance des travaux sur les savons entrepris par Mc Bain dans cet état d'esprit incitait à aborder la question avec les protéines.

Aussi avons-nous commencé par étudier tout simplement les domaines d'existence des phases, et leur composition en rapport avec celle du mélange global ; la notion de solubilité des protéines a pu ainsi être pour la première fois définie avec rigueur.

Ensuite nous avons été conduit à particulariser les conditions de ces équilibres en limitant la diffusion de la protéine à une partie du système au moyen d'une membrane semiperméable. Cette manière de procéder s'est révélée extrêmement fructueuse et nous a permis de préciser deux points essentiels : l'hydratation des protéines et leur fractionnement par les solutions salines.

Tel est l'objet de la première partie de cette étude.

Dans l'espoir de pouvoir pénétrer le mécanisme du relargage, nous avons d'autre part examiné le cas extrême où la diffusion de la protéine est limitée à une interface du système : nous voulons parler de l'étude des couches monomoléculaires de protéine à la surface des solutions salines. C'est essentiellement aux mesures de variation du potentiel de surface que nous nous sommes adressé, mesures auxquelles est consacrée la deuxième partie de ce travail qui fut peut-être plus laborieuse que la première, mais beaucoup moins fructueuse.

Une notion que nous avons essayé de préciser est celle de la pureté des protéines.

A-t-on le droit de parler de pureté des protéines ? La notion même de protéine pure a-t-elle un sens ? Les progrès récents dans le domaine de l'analyse et de la synthèse des polypeptides semblent permettre à la biochimie de répondre par l'affirmative. Du point de vue physicochimique, c'est par l'étude quantitative et rigoureuse de la solubilité et du fractionnement ainsi que par l'examen de l'application de la règle des phases aux systèmes protéine-sel-eau que nous avons cherché la réponse à cette question essentielle.

PREMIÈRE PARTIE

LES SYSTÈMES PROTÉINE-SEL-EAU ÉQUILIBRES DE PHASES ET ÉQUILIBRES AVEC MEMBRANE

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

Cette étude porte sur des protéines du sérum sanguin de cheval ou de bœuf.

Nous avons utilisé comme matériel les protéines sériques pour des raisons d'ordre essentiellement pratique, l'Institut Pasteur pouvant nous fournir du sérum de cheval régulièrement et en quantité relativement importante. La même étude aurait aussi bien pu être entreprise avec d'autres protéines animales ou végétales.

Extraction des protéines sériques.

La méthode d'extraction suivie est celle de SÖRENSEN et HÖYRUP (1) que PÉREZ a décrite sous forme simplifiée (2). On utilise le relargage par le sulfate d'ammonium. Le sérum est additionné d'un égal volume de solution saturée de sulfate d'ammonium. On sépare le précipité de globulines par centrifugation.

Les globulines sont remises en solution par addition d'eau au précipité, puis de nouveau relarguées, et ceci à deux reprises. Le dernier précipité obtenu est directement dialysé, sans dissolution préalable. Au bout d'une dizaine de jours, les euglobulines qui ont précipité sont séparées par centrifugation et dissoutes dans une solution saline contenant un peu de sulfate d'ammonium (environ 2 p. 100).

La solution de pseudoglobulines est filtrée et, s'il y a lieu, concentrée par évaporation dans un courant d'air, à travers une membrane identique à celle utilisée pour la dialyse.

Quant aux eaux-mères contenant les albumines, elles sont amenées très doucement à pH = 4,8 au moyen d'acide sulfurique dilué, ce qui amorce la cristallisation. Au bout de 24 heures, on centrifuge à faible vitesse, on lave les cristaux sur filtre BÜCHNER avec une solution demi-saturée en sulfate d'ammonium, puis on les dissout dans de l'eau distillée (environ 40 cm^3 par litre de sérum initial). On centrifuge et on fait recristalliser les albumines par demi saturation en sulfate d'ammonium. Après un deuxième lavage et une troisième cristallisation, les cristaux sont dissous et dialysés.

Les solutions aqueuses de protéines ainsi obtenues ont été utilisées pour les expériences, soit telles quelles, soit après avoir été lyophilisées. La lyophilisation présente plusieurs avantages : on peut conserver les stocks de protéines sans crainte d'altération au cours du temps, alors qu'en solution, même à froid, les protéines s'altèrent toujours au moins légèrement. Elle permet d'en préparer en une seule fois des quantités importantes. On peut ainsi effectuer un grand nombre d'expériences comparables entre elles avec les meilleures conditions de fidélité, ce qui n'est plus le cas avec des solutions de protéine provenant de préparations différentes.

Ces mêmes raisons nous ont conduit à l'emploi de sérumalbumine de bœuf préparée industriellement, ce qui avait de plus l'avantage d'économiser le temps relativement long requis par l'extraction de ces protéines. L'échantillon utilisé était la fraction V des Établissements Armour.

Dialyse.

Nous avons été amené à monter un dialyseur à marche continue capable de recevoir d'assez grosses quantités de protéines et inspiré d'un dispositif utilisé par MONOD (3).

Comme le montre la figure 1, la solution à dialyser est enfermée dans un sac en forme de boudin d'environ 30 cm de long sur 2,5 cm de diamètre, constitué par de la viscose (provenant de la Visking Corporation). Le sac à dialyse est lui-même placé dans un tube en verre à l'intérieur duquel on établit une circulation d'eau bidistillée.

Le tube de verre est arrimé sur un plateau qui oscille lentement de part et d'autre de la position horizontale (de $\pm$ 30°).

On prend soin de laisser une bulle d'air à l'intérieur du sac à dialyse et une autre dans le tube de verre. A chaque oscillation du plateau, ces bulles parcourent la solution dialysée et l'eau dialysante et brassent ainsi doucement le milieu.

Le plateau oscillant peut recevoir 6 tubes de verre placés en série en ce qui concerne la circulation d'eau. En amont du premier tube, un « piège à ions » préserve le stock d'eau bidistillée de toute pollution éventuelle par les ions. En aval du dernier tube à dialyse, une cellule à conductivité permet de connaître à chaque instant la résistance de l'eau et par conséquent sa teneur en sel.

Lorsque la résistance atteint 3 à 4×10^5 ohm $\times$ cm, on arrête l'écoulement, on agite pendant 24 heures pour que les concentrations ioniques prennent leurs valeurs d'équilibre de part et d'autre de la membrane dialysante et on vérifie que la conductibilité est du même ordre que celle de l'eau bidistillée.

Le même montage permet de concentrer les solutions de protéines en substituant un courant d'air à la circulation d'eau.

Processus expérimental.

Cette étude sur les mélanges de protéine, de sel et d'eau présente deux aspects différents suivant qu'il y a libre diffusion des 3 constituants ou, qu'au contraire, au moyen d'une membrane semi-perméable, on empêche l'un des constituants de diffuser dans une partie du système.

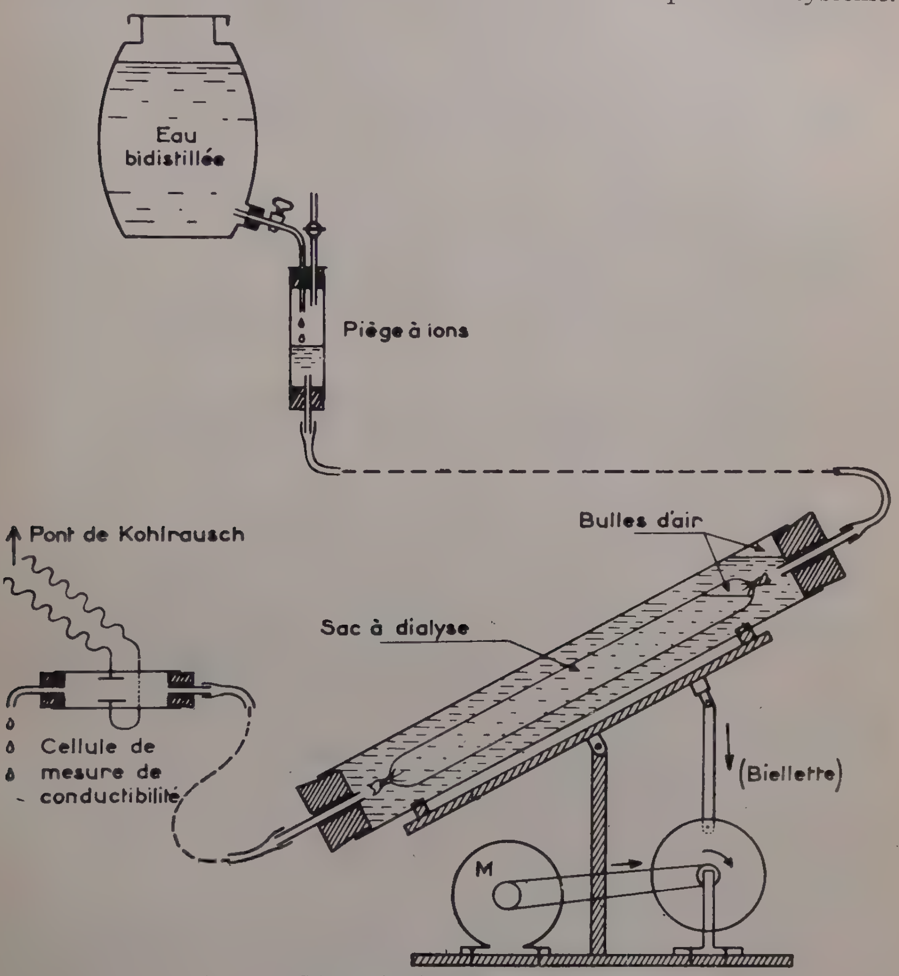


Fig. 1. — Schéma du dispositif utilisé pour la dialyse.

Le processus expérimental comporte toujours deux temps : en premier lieu, la préparation des systèmes protéine-sel-eau, qui consiste à mettre en présence — avec ou sans interposition de membrane — une solution aqueuse de protéine et une solution aqueuse d'un sel déterminé ; en second lieu, la détermination des caractéristiques de l'équilibre (lorsque celui-ci est atteint à température et pH constants) et leur traduction par des diagrammes ternaires à propos desquels nous nous permettrons quelques rappels et quelques précisions.

Préparation des systèmes protéine-sel-eau.

Dans le cas des équilibres protéine-sel-eau avec libre diffusion des trois constituants, on mélange dans les proportions pondérales voulues une solution aqueuse de protéine et une solution aqueuse de sulfate d'ammonium de concentrations respectives connues (déterminées par extrait sec comme indiqué plus loin). La solution de protéine est toujours versée la première. Ensuite on lui ajoute, en agitant doucement, la solution de sulfate d'ammonium. L'inverse risquerait de provoquer de fortes concentrations locales en sel qu'il est préférable d'éviter. Pour cette même raison, le sulfate d'ammonium est ajouté sous forme de solution aqueuse et non pas sous forme de cristaux (le plus souvent, il s'agit d'une solution saturée de sulfate d'ammonium).

L'opération se fait dans des tubes à centrifugeuse préalablement tarés. Une fois remplis, ces tubes sont repesés, ce qui donne la masse m du système étudié, puis bouchés et placés à l'étuve à 23°, où ils séjournent pendant 48 heures, temps au bout duquel l'équilibre est toujours atteint.

Dans le cas où une membrane est utilisée pour empêcher la diffusion de la protéine dans toutes les parties du système, on part comme précédemment de deux solutions aqueuses, l'une de protéine, l'autre de sel, de concentrations connues. La solution aqueuse de protéine est renfermée dans un sac à dialyse que l'on immerge au sein de la solution saline. En général, l'équilibre n'est atteint qu'au bout de plusieurs jours. Ce délai peut être un peu réduit par l'emploi de sacs à dialyse de faible diamètre (de 0,5 à 1 cm) pour lesquels le rapport surface/volume qui intervient est relativement grand.

Le système se trouve donc ainsi divisé en deux parties. Pour simplifier et par commodité de langage, nous désignerons par « système intérieur » la partie du système contenant la protéine (et toujours située à l'intérieur du sac) et par « solution extérieure » l'autre partie qui se réduira toujours à une solution saline.

Nous verrons que l'un des deux principaux paramètres déterminant l'état de ces systèmes à l'équilibre est la concentration — à l'équilibre — de la solution saline extérieure. Le moyen pratique le plus simple de fixer ce paramètre à la valeur désirée à l'équilibre est d'immerger un sac à dialyse de petit volume — rempli de solution protéique — dans un très grand volume de solution saline. La variation de concentration de cette dernière durant les échanges à travers la membrane devient alors négligeable. En fait, nous avons presque toujours opéré avec des sacs à dialyse d'une capacité d'environ 5 cm³, immergés dans un volume de solution saline d'au moins 1 litre. De sorte que la concentration saline de la solution extérieure subissait une variation relative inférieure ou

égale au 1/200 entre le début (conditions initiales) et la fin de l'opération (conditions d'équilibre).

Lorsque les conditions d'équilibre sont réalisées, l'expérience montre que deux cas peuvent se présenter : l'intérieur du sac à dialyse peut contenir une solution, ou un précipité et un surnageant.

Quoiqu'il en soit, le contenu du sac est versé dans un récipient taré (un tube à centrifugeuse s'il y a deux phases à séparer) et l'on détermine sa masse. On est alors ramené, pour l'analyse, au même problème que précédemment dans le cas des équilibres sans membrane : il s'agit de déterminer la composition de mélanges de deux ou trois des constituants protéine, sel et eau.

Précisons que dans chaque série d'expériences, le pH des systèmes étudiés a été maintenu constant par ajustage éventuel au moyen de l'acide ou de la base correspondant au sel déjà présent (de façon à ne pas introduire d'ions autres que ceux du sel utilisé). Il a été également contrôlé à l'équilibre dans les différentes phases.

Analyse des mélanges protéine-sel-eau.

Si le système — le système global dans le cas des équilibres sans membrane, le système intérieur dans le cas des équilibres avec membrane — donne un précipité, le tube est centrifugé pendant environ 5 minutes à une vitesse comprise entre 2 et 3 000 tours/minute. La phase surnageante est décantée dans un récipient taré et l'on détermine sa masse m_1 ainsi que la masse m_2 du précipité.

La composition d'une phase ou d'un mélange quelconque contenant protéine, sel et eau est déterminée de façon relativement directe. Un poids connu de la phase est évaporé à sec pendant 48 heures à 110° ; pratiquement un poids constant est atteint au bout de 24 heures. On en déduit la quantité d'eau. Le résidu est ensuite lavé un grand nombre de fois avec de petites quantités d'eau distillée, ce qui élimine le sel par dissolution, tandis que la protéine cornée demeure insoluble. Une nouvelle dessiccation dans les mêmes conditions, suivie de pesées, donne le poids de protéine et, par différence, celui de sel. La validité de cette méthode a, bien entendu, été contrôlée en opérant à partir de mélanges de composition connue *a priori*. Ainsi le dosage de la protéine se fait directement par pesée de l'extrait sec sans passer par l'intermédiaire de la méthode de KJELDAHL.

Il ne faut pas perdre de vue, en effet, que cette dernière méthode de dosage suppose une détermination préalable du coefficient protéine/azote par extrait sec. Son emploi est d'ailleurs moins indiqué lorsqu'on se trouve en présence de sels d'ammonium, parce que plus délicat.

L'analyse directe par extrait sec présente un certain nombre d'avantages et d'inconvénients.

Elle permet l'emploi, sans complication, de sels d'ammonium. Mais dans ce dernier cas, elle suppose qu'on se place en milieu acide, à un pH inférieur ou égal à 6,5 ; au-delà de cette valeur, les sels d'ammonium se décomposent par suite du dégagement d'ammoniaque. D'autre part, elle implique que les sels dosés sont stables à 110° et non déliquescents.

Autre limitation : elle n'est pas applicable à n'importe quelle protéine. Si les fractions du sérum sanguin sont parfaitement insolubles après coagulation et dessication à 110°, il n'en est plus du tout de même de la gélatine, par exemple, dont une partie demeure soluble après un tel traitement.

Cette analyse, en outre, exige une précaution : les évaporations à sec à 110° doivent se faire sous une faible épaisseur initiale de liquide, moyennant quoi, après le départ de l'eau, la protéine forme une croûte cornée recouverte d'efflorescences blanches constituées par les cristaux de sel. Par lavage, on obtient alors une pellicule protéique vitreuse et transparente. En évaporant sous une épaisseur trop grande (supérieure à 1 cm pour un mélange contenant de l'ordre de 15 p. 100 de protéine), une partie du sel risque de rester prise dans la masse de protéine séchée et nécessite, pour être dissoute, une pulvérisation préalable, ce qui complique le procédé et diminue son intérêt.

Enfin, si on veut une précision convenable, nous verrons plus loin que cette méthode exige que toute phase analysée contienne au moins quelques décigrammes de protéine, ce qui suppose pour les mélanges initiaux des poids de protéine de l'ordre de 0,5 à 1 g. Mais cette condition se trouve déjà imposée par la necessité, pour séparer convenablement les phases, d'opérer sur des quantités de mélange de l'ordre d'une vingtaine de grammes.

Dosage des protéines par extrait sec et dosage par Kjeldahl.

Il est intéressant de jeter un regard sur les méthodes d'analyse similaires qui ont déjà pu être utilisées.

En 1905, Galeotti (4) essayait déjà une ébauche de diagramme de phases avec des systèmes ovalbumine-sulfate d'ammonium-eau, travail sur lequel nous aurons l'occasion de revenir. Pour analyser un mélange des 3 constituants, Galeotti en évaporait une quantité connue à 100° jusqu'à un poids constant, et éliminait le sulfate d'ammonium par lavage à l'eau chaude sur filtre. L'ovalbumine restée sur le filtre était séchée et pesée. Quant au sulfate d'ammonium, il était dosé dans le filtrat par précipitation sous forme de sulfate de baryum (par Cl_2Ba).

CHICK et MARTIN (5), en 1913, opéraient d'une façon assez voisine, en pesant la protéine après coagulation.

Durant ces dernières années, MC MEEKIN et ses collaborateurs (6), étudiant la composition de cristaux de protéines, ont évalué la quantité de protéine en se basant sur le poids sec : ils coagulaient les cristaux avec un peu d'eau bouillante, lavaient à l'eau chaude et mesuraient la quantité de sel en dosant l'ammonium dans les eaux de lavage. Ces auteurs ont vérifié que la température de dessiccation n'influait pas, dans un large domaine, sur l'évaluation du poids sec de la protéine.

SÖRENSEN et ses collaborateurs (1) sont les seuls auteurs, à notre connaissance, à avoir dosé chimiquement les protéines (par KJELDAHL) ainsi que le sulfate d'ammonium. Leurs mesures ont été effectuées avec un soin et une précision admirables. Leur nombre est, en revanche, assez limité.

Mis à part ceux que nous venons de passer en revue, la quasi totalité des auteurs qui ont travaillé sur les solutions salines de protéines, leur précipitation et leur solubilité, ont préféré éviter l'emploi de sels d'ammonium pour pouvoir doser plus facilement l'azote protéique par la méthode de KJELDAHL.

Représentation des résultats sur des diagrammes.

Les caractéristiques des équilibres protéine-sel-eau ainsi déterminées sont traduites par des diagrammes triangulaires dont les sommets correspondent à 100 p. 100 de protéine, de sel et d'eau respectivement. Les compositions centésimales des mélanges initiaux ou des phases séparées à l'équilibre sont représentées par des points intérieurs au diagramme.

Nous avons adopté des triangles isocèles rectangles, et non pas équilatéraux. Tout revient alors à utiliser un système d'axes rectangulaires Os, Op (fig. 2), ce qui est plus pratique. En abscisses sont portées les compositions centésimales en sel s ; en ordonnées celles en protéine p. Ces quantités pouvant théoriquement varier entre 0 et 100, tous les points représentatifs sont intérieurs au triangle rectangle OAB dont les sommets correspondent à 100 p. 100 d'eau pour O, 100 p. 100 de sel pour A, et 100 p. 100 de protéine pour B. La composition centésimale en eau est fournie par la projection du point représentatif sur la médiatrice HO de l'hypoténuse.

Rappelons deux propriétés élémentaires du diagramme employé. Si les points M, Φ_1 et Φ_2 représentent respectivement les compositions du mélange initial, de la phase surnageante et de la phase précipitée :

1° Les points Φ_1, M, et Φ_2 sont alignés sur une droite dite *ligne de conjugaison*.

2° Le rapport des distances des points Φ_1 et Φ_2 au point M est inverse du rapport des poids des phases. Autrement dit, on a :

$$\frac{M\Phi_2}{M\Phi_1} = \frac{m_1}{m_2}.$$

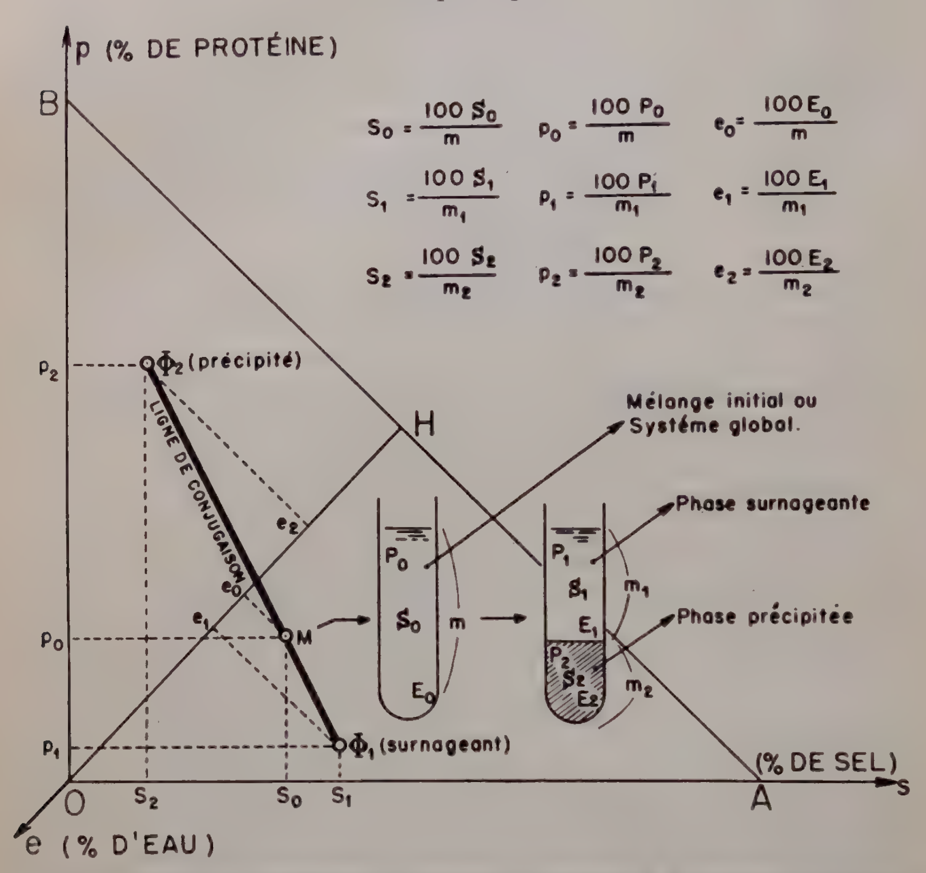


FIG. 2. — Principe de la représentation sur diagramme triangulaire de la composition centésimale des systèmes protéine-sel-eau et des phases séparées.

La position des trois points M, Φ_1 et Φ_2 caractérise complètement la démixtion d'un mélange donné par la composition des phases et leurs proportions relatives. Mais, en principe, il n'est pas nécessaire d'analyser les deux phases pour pouvoir déterminer le système. Il est en effet évident que, puisque l'on connaît le poids et la composition du mélange initial, la détermination du poids et de la composition d'une seule des phases suffit pour calculer par différence le poids et la composition de l'autre. Néanmoins, dans beaucoup de cas où l'analyse est possible pour les deux phases, on dispose de données supplémentaires qui constituent un contrôle.

De façon plus précise, on peut déterminer pour un mélange initial

les poids P_0, S_0 et E_0 de protéine, de sel et d'eau et, pour chacune des phases, les quantités correspondantes P_1, S_1, E_1 et P_2, S_2, E_2, ce qui donne neuf paramètres alors qu'il suffit d'en connaître six pour calculer les autres d'après la règle des mélanges. La composition (P_0,S_0, E_0) du mélange initial est évidemment connue. D'une façon générale, la composition du surnageant (P_1, S_1, E_1) est considérée comme la plus sûre et l'on peut, à partir de ces données, calculer la composition (P_2, S_2, E_2) du précipité. On peut aussi opérer graphiquement en utilisant les propriétés des diagrammes de phases rappelées précédemment. On n'utilise pour cela que le rapport m_1/m_2 des masses des deux phases, en plaçant le point représentatif Φ_2 du précipité sur la ligne de conjugaison joignant Φ_1 (surnageant) à M (mélange initial) à une distance $M\Phi_2$ telle que le rapport de $M\Phi_1$ à $M\Phi_2$ soit l'inverse de celui des masses des phases (conformément à l'égalité ci-dessus).

Théoriquement, les résultats de l'analyse directe de la phase précipitée (P_2, S_2, E_2) doivent coïncider avec les résultats calculés à partir des compositions du surnageant et du mélange initial ou, ce qui revient au même, avec ceux déduits de la construction graphique précédente. Cette coïncidence est réalisée en pratique dans les limites des erreurs expérimentales. Pour les rares cas où la discordance est trop flagrante, les résultats ont été rejetés ou bien les valeurs déduites graphiquement, qui sont théoriquement les plus valables, ont été adoptées. Nous reviendrons sur ce point en analysant les diagrammes.

Signalons enfin que, dans le cas des équilibres avec membrane, le point représentant la composition du système global, c'est-à-dire l'ensemble des deux parties, extérieure et intérieure au sac, ne présente pas d'intérêt. Aussi n'est-il jamais figuré.

Le système intérieur est représenté par un point M. Si le sac contient une solution, le point M donne sa composition ; s'il contient deux phases, celles-ci sont représentées par deux points Φ_1 et Φ_2. Quant à la solution saline extérieure, sa composition est donnée par un point de l'axe des abscisses.

Causes d'erreur et précision des mesures.

La détermination de la composition du système global ne présente pas de difficultés et peut être faite avec toute la précision permise par la méthode d'analyse employée. Il en est de même pour le surnageant dont il est toujours possible de prélever une partie dépourvue de précipité. De sorte que les positions des points M et Φ_1 (fig. 2) et par conséquent aussi celle de la ligne de conjugaison qui les joint, ne sont pas sujettes à d'autres erreurs que celles dues à la limite de sensibilité des dosages.

En revanche, pour la composition du précipité, la principale cause

d'erreur réside dans une séparation imparfaite des deux phases. Bien que la centrifugation donne une séparation nette en apparence, la phase précipitée reste en effet toujours partiellement imbibée par le surnageant et, à l'analyse, paraît avoir une composition moins éloignée de celle du surnageant qu'en réalité. (Nous serons d'ailleurs amené à montrer comment on peut néanmoins arriver à connaître les véritables masses des deux phases et la composition réelle du précipité.)

Si, par exemple, on suppose que 20 p. 100 du poids du précipité apparent sont constitués par du surnageant, cela entraîne sur la composition en protéine dans le précipité une erreur relative par défaut inférieure à 20 p. 100 dans les conditions les plus défavorables (c'est-à-dire lorsque les compositions centésimales des deux phases sont les plus différentes possible l'une de l'autre). Autrement dit, si l'analyse d'un précipité indique une composition de 25 p. 100 en protéine, la composition réelle est certainement inférieure à 30 p. 100. L'erreur sur la composition en sel due à la même cause est toujours par excès. Sa valeur relative dans les mêmes conditions les plus défavorables, est inférieure à 15 p. 100. (Par exemple, on a certainement plus de 11 p. 100 de sel dans un précipité dont l'analyse a indiqué 13 p. 100.) L'erreur est aussi par excès pour l'eau, mais sa valeur relative n'excède pas 5 p. 100 (si, par exemple, on trouve 60 p. 100 d'eau, c'est qu'il y en a au minimum 57 p. 100).

Mais il est absolument essentiel de noter que, si imparfaite que puisse être la séparation du précipité, on sait que son point représentatif Φ_2 est obligatoirement sur la ligne de conjugaison Φ_1 M dont la position ne dépend pas du degré d'imbibition du précipité par le surnageant. Les conséquences d'une mauvaise séparation des phases sur l'analyse du précipité sont donc malgré tout limitées, puisque l'*incertitude sur la position du point* Φ_2 *est localisée*, non pas dans le plan OsOp, mais seulement *sur la ligne de conjugaison* Φ_1 M.

Par ailleurs, à supposer que la détermination des compositions des phases précipitées soit entachée d'une erreur systématique de l'ordre de grandeur envisagé ci-dessus, la variation relative de ces compositions en fonction de celles des systèmes globaux n'en reste pas moins instructive.

Des réserves doivent être faites également en ce qui concerne la composition des premiers précipités formés : l'importance de la phase précipitée par rapport à la masse totale du système est alors trop faible pour en déterminer la composition ou même en évaluer la masse approximative.

Insistons dès maintenant sur le fait que la plupart des conclusions auxquelles conduit le présent travail n'exigent pas la connaissance de la composition des précipités, mais sont essentiellement fondées sur la détermination des lignes de conjugaison.

Il reste à examiner l'importance des erreurs dues à la limite de sen-

sibilité des appareils de mesure, en l'occurrence de la balance qui sert aux pesées. Comme les quantités de constituants sont évaluées par différence de deux pesées, l'erreur absolue n'excède pas ± 2 milligrammes. Les quantités de protéine, de sel et d'eau étant chacune au moins de l'ordre de 500 mg, l'erreur relative due aux pesées n'excède pas ± 1 p. 100. L'erreur commise sur le poids des phases est du même ordre (abstraction faite d'une séparation imparfaite possible). L'erreur sur la position des points M et Φ_1 est, par conséquent, inférieure ou égale à 2 p. 100 en valeur absolue.

Electrophorèse des fractions protéiques.

Certaines des fractions protéiques étudiées ont été analysées par électrophorèse. Nous donnerons à ce propos seulement quelques indications, étant donné que nous n'avons pas effectué nous-même l'opération (1).

L'appareil utilisé était un Tiselius avec un dispositif d'observation du type Philpot-Svensson. Les protéines ont été étudiées à une concentration de 1 à 2 p. 100 dans un mélange tampon phosphate-solution de chlorure de sodium ; à un pH de 7,6 ; une température de 2°C, avec un gradient de potentiel de l'ordre de 5 volt/cm et pendant des durées de 3 à 4 heures. L'analyse des constituants a été faite d'après la photographie de la frontière descendante. Pour la détermination des aires, on a eu recours à la décomposition en courbes supposées gaussiennes par convention.

Chapitre II

ÉTUDE DES ÉQUILIBRES PROTÉINE-SEL-EAU (AVEC LIBRE DIFFUSION DES TROIS CONSTITUANTS)

Nous allons constamment parler de phases et d'équilibre de phases.

A ce propos, un point essentiel à souligner, dès l'abord, est que le précipité obtenu par addition de sel à une solution aqueuse de protéine est considéré comme une phase qui est en équilibre avec le surnageant et dont la composition varie en même temps que celle du surnageant. Le fait que le précipité puisse être plus ou moins imbibé de surnageant n'implique pas qu'il ne s'agisse pas d'une phase bien définie ; pas plus

(1) Ces analyses ont été effectuées dans le Laboratoire de M. P. Grabar, à l'Institut Pasteur, par les soins de Mlle G. Christol. Nous tenons à les remercier pour cette précieuse contribution.

que l'imbibition, par du solvant, d'un sel minéral précipité de sa solution n'empêche d'envisager les cristaux précipités comme une phase bien définie.

La notion de phase n'implique pas non plus la connaissance du nombre total de constituants. Dans le cas présent, on sait que la partie protéique du précipité comme celle du surnageant est formée d'un mélange et ne peut intervenir comme un seul constituant dans l'utilisation de la règle des phases. Néanmoins, il est toujours permis de tracer des diagrammes ternaires dans lesquels on porte la composition en protéine ; c'est seulement dans l'interprétation des résultats expérimentaux qu'il faudra tenir compte du fait qu'il ne s'agit pas d'un constituant pur.

Bien que ce dernier point puisse paraître évident, nous croyons devoir y insister étant donnée la conception erronée que l'on trouve répandue à cet égard dans nombre de travaux. Beaucoup d'auteurs croient en effet que la construction d'un diagramme exige que la règle des phases de Gibbs soit applicable : c'est par exemple le cas d'OSTWALD (7). L'expression regrettable de « phase rule diagram » employée par les Anglais pour désigner les diagrammes de phases, risque également d'induire en erreur à ce sujet.

1. — Résultats expérimentaux.

Lorsqu'on ajoute du sel à une solution aqueuse de protéine, on trouve qu'il existe deux proportions salines particulières entre lesquelles se produit le phénomène du relargage proprement dit.

En deçà de la plus faible de ces proportions, le mélange est soluble. Entre les deux proportions, on a un précipité qui s'enrichit aux dépens d'une liqueur mère ou surnageant. Lorsque l'on atteint la plus grande de ces proportions, toute la protéine se trouve précipitée, de sorte qu'au-delà de cette proportion, la solution en équilibre avec le précipité ne contient plus que du sel et de l'eau.

C'est la zone du relargage proprement dit qui nous intéressera plus particulièrement dans ce chapitre.

Nous l'avons étudiée avec des protéines cristallisées et avec des protéines amorphes et nous envisagerons successivement ces deux cas qui conduisent à des conclusions identiques.

Équilibre précipité-surnageant.

Qu'il s'agisse d'un précipité cristallin ou non, pour tous les systèmes étudiés avec différentes protéines et différents sels, on constate de façon absolument générale que la phase précipitée est toujours plus riche en protéine et plus pauvre en eau et en sel que le système global ; la phase

liquide (surnageant) est moins riche en protéine et plus riche en sel et en eau que le système global et, *a fortiori*, que la phase précipitée. Ce résultat corrobore les remarques antérieures de Chick et Martin (5). Graphiquement, ceci se traduit par le fait que les lignes de conjugaison ont une pente négative ; la démixtion d'un système présente l'aspect schématisé sur la figure 2.

Comme la composition de chacune des phases qui se séparent dépend de celle du système global, c'est-à-dire des proportions en sel et en protéine du mélange initial, on est tout naturellement conduit à examiner comment se modifie l'équilibre quand on maintient constant l'un ou l'autre de ces deux paramètres (des trois proportions de sel, de protéine et d'eau, deux seulement sont indépendantes).

Systèmes de même composition centésimale en protéine.

La figure 3 rassemble les résultats obtenus avec la sérumalbumine de cheval à pH = 4,7.

La composition centésimale en protéine des systèmes a été maintenue constante et égale à 10,3 p. 100 (soit 10,3 g de protéine pour 100 g du mélange protéine + sel + eau). La composition centésimale en sel des systèmes a varié entre 17 et 25 p. 100 de sulfate d'ammonium. Les points représentatifs des différents systèmes étudiés se trouvent donc sur une droite horizontale d'ordonnée 10,3. La courbe du haut passe par les points représentant les compositions des phases précipitées ; celle du bas passe par les points représentatifs des phases surnageantes. Cette dernière correspond à ce que de nombreux auteurs appellent à tort une « courbe de solubilité ».

Remarquons que les courbes analogues répandues dans la littérature représentent les variations de la proportion de protéine dans le surnageant plus souvent en fonction de la concentration saline globale qu'en fonction, comme ici, de la proportion de sel dans le surnageant. Malgré la légère différence qui en résulte pour la forme des courbes, il n'en est pas moins erroné de les considérer comme des courbes de solubilité.

Ainsi que nous l'avons dit, les ligues de conjugaison joignent les points représentatifs des phases en équilibre, en passant par celui qui représente la composition du mélange dont elles proviennent. Et comme les poids des phases en équilibre sont dans le rapport inverse des distances de leurs points représentatifs à celui du mélange dont elles proviennent, leur importance relative peut être retrouvée à partir du diagramme.

On voit que, pour une proportion croissante de sel dans le système global, le pourcentage de sel augmente constamment dans les deux phases.

En se référant à l'axe indiquant la composition centésimale en eau,

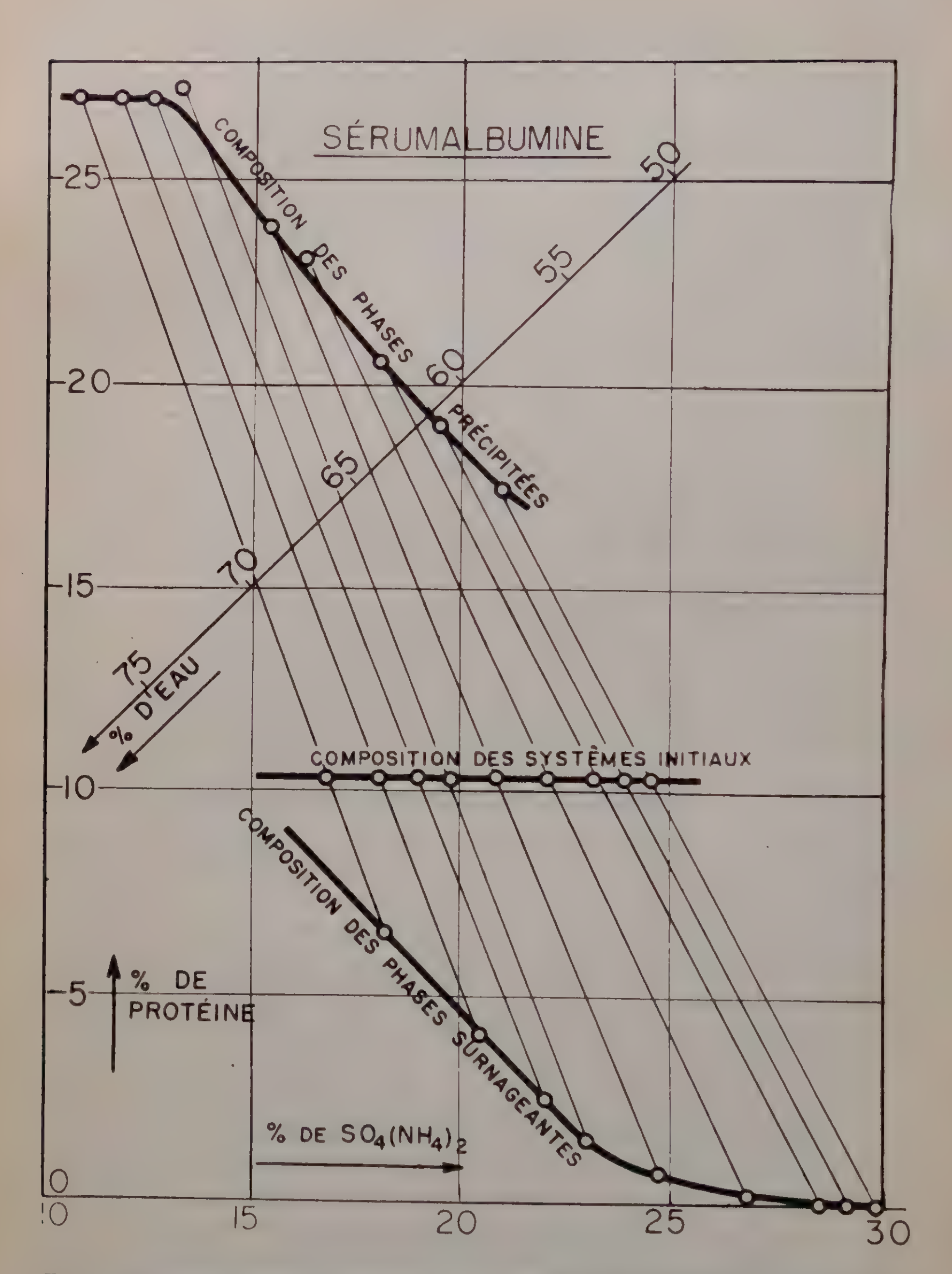


FIG. 3. — Diagramme donnant la composition des phases pour des systèmes sérumalbumine (cheval)-sulfate d'ammonium-eau. — Température : 23°C ; pH = 4,7.

on peut se rendre compte que la proportion d'eau, dans le précipité comme dans le surnageant, varie peu alors que la composition en sel croît.

La proportion de protéine décroît bien entendu sans arrêt dans le surnageant jusqu'à ce que ce dernier se réduise à une solution saline.

Dans le précipité de cristaux, le phénomène est un peu moins simple.

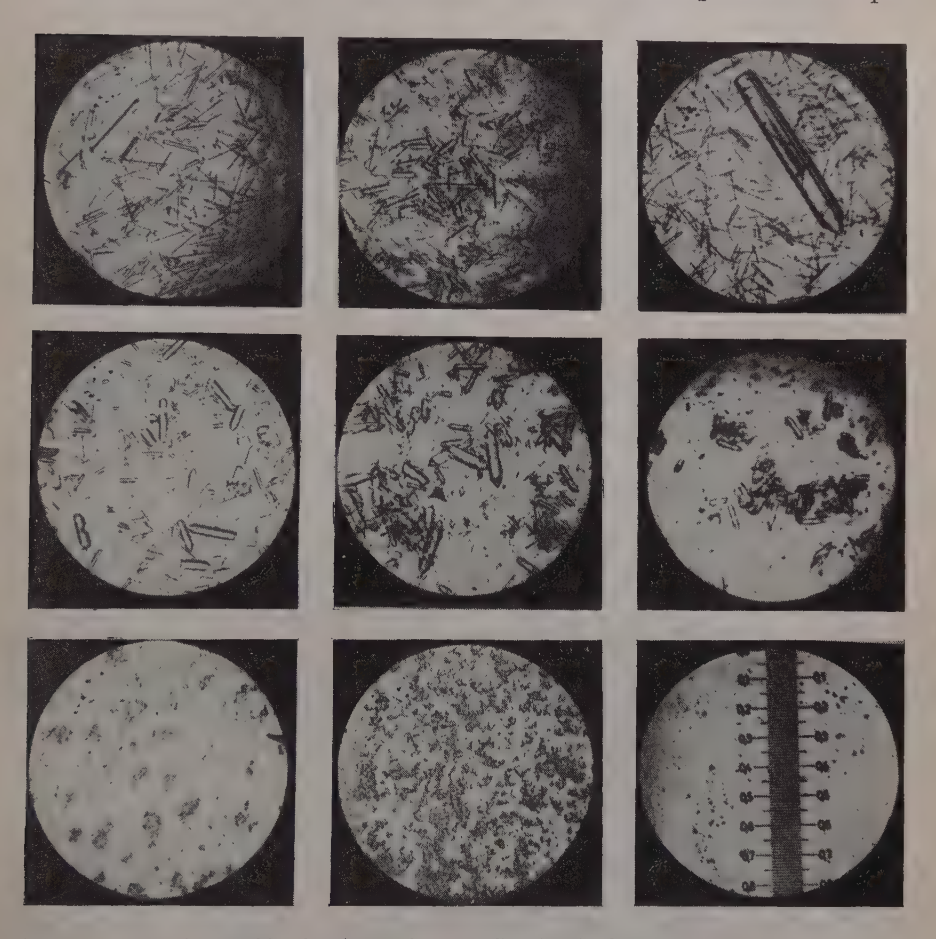


FIG. 4. — Photomicrographies de cristaux de sérumalbumine de cheval prélevés dans les précipités dont la figure 3 indique la composition. Les 8 vues, de gauche à droite et de haut en bas, correspondent aux 8 premiers systèmes de la figure précédente. Largeur du champ : environ 1 mm.

D'une part, la proportion de protéine (par rapport à la phase cristalline totale), d'abord constante dans un premier intervalle, devient rapidement décroissante. Mais d'autre part la quantité absolue de protéine présente y augmente, puisque les cristaux prennent naissance aux dépens de la liqueur mère. Et l'examen microscopique des cristaux auquel nous avons procédé montre que ceux-ci augmentent soit en taille, soit en nombre.

Le diagramme représenté sur la figure 3 comporte neuf systèmes. Pour chacun d'eux (exception faite du dernier), un prélèvement a été effectué sur le précipité et photographié au microscope avec un agrandissement linéaire de l'ordre de 50. Les huit photographies obtenues sont rassemblées sur la figure 4.

Il semble qu'on puisse classer ces cristaux en trois catégories, correspondant aux trois rangées horizontales de la figure 4. Dans les trois premiers précipités de même composition en protéine, les cristaux ont sensiblement des dimensions du même ordre. Dans les trois suivants, de composition décroissante en protéine, la taille moyenne est plus grande. Mais dans les derniers, alors que la composition en protéine diminue toujours, la taille est beaucoup plus faible, tandis que le nombre est considérablement plus élevé. On peut probablement expliquer cette dernière forme par une grande rapidité de cristallisation. Pour les derniers systèmes en effet, toute la protéine participe à la formation des cristaux, puisque la liqueur mère se réduit à une solution saline ; et en même temps, la proportion globale de sel y est la plus élevée. Or, comme cette quantité de sel a été ajoutée sous forme de solution saturée à une solution aqueuse de protéine en l'espace de quelques secondes, les cristaux ont pris naissance en grand nombre, sans avoir le temps de croître.

On peut évidemment se demander si ces trois catégories de cristaux ne correspondraient pas à des formes différentes de sérumalbumine. Sans vouloir rejeter *a priori* cette hypothèse, nous ne pensons pas avoir suffisamment d'éléments pour l'envisager.

Après avoir examiné, grâce au diagramme de la figure 3, comment varie la proportion de chacun des constituants protéine-sel-eau, par rapport à l'ensemble des trois, il est instructif d'envisager pour la phase cristalline les rapports pondéraux de deux de ces constituants entre eux, à savoir :

le rapport S_2/E_2 du sel à l'eau, c'est-à-dire la concentration saline dans l'eau de la phase cristalline ;

le rapport S_2/P_2 du sel à la protéine.

le rapport E_2/P_2 de l'eau à la protéine, sans préjuger du fait que cette eau peut être ou non partiellement liée à la protéine ;

Les figures 5, 6, 7 donnent les variations de ces trois rapports dans la phase précipitée en fonction de la concentration saline S_1/E_1 dans l'eau du surnageant.

En première approximation, la concentration saline dans l'eau de la phase cristalline croît linéairement en fonction de celle du surnageant (fig. 5), avec une pente un peu inférieure à l'unité ; la courbe est analogue à celle donnée par PERUTZ (8) pour l'équilibre de cristaux d'hémoglobine dans des solutions de sulfate d'ammonium.

La quantité de sel rapportée à celle de protéine dans la phase pré-

cipitée croît de plus en plus rapidement (fig. 6) tandis que la quantité d'eau rapportée à celle de protéine passe par un minimum (fig. 7).

Ces résultats sont aussi en excellent accord avec ceux de PERUTZ. Une seule différence apparente : le rapport E_2/P_2 (de la masse d'eau rapportée

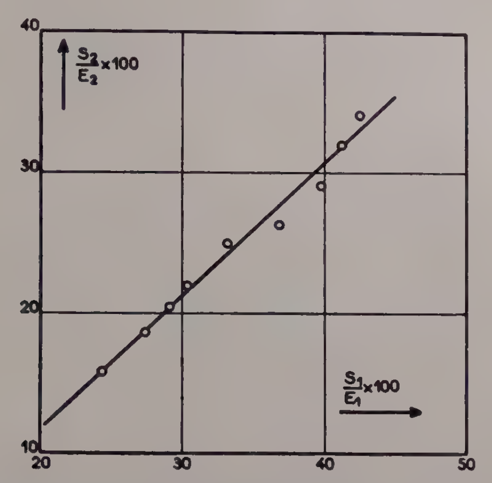


FIG. 5. — Étude des précipités de cristaux de sérumalbumine : variation du rapport pondéral sel/eau évalué dans le précipité en fonction du rapport pondéral sel/eau évalué dans la liqueur mère en équilibre (ou surnageant).

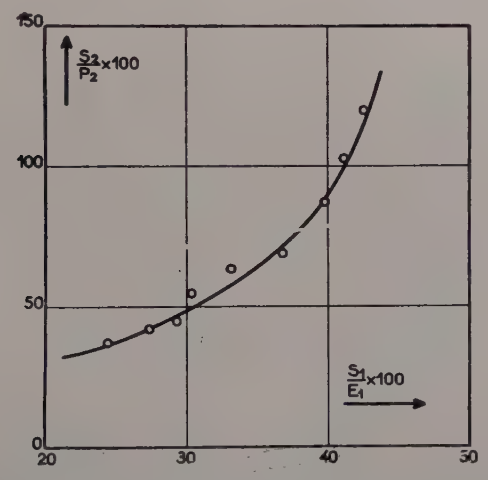


FIG. 6. — Étude des précipités de cristaux de sérumalbumine : variation du rapport sel/protéine évalué dans le précipité en fonction du rapport pondéral sel/eau évalué dans la liqueur mère en équilibre (ou surnageant).

à celle de protéine dans le précipité de cristaux) passe par un minimum pour la sérumalbumine de cheval, alors qu'il décroît sans cesse pour l'hémoglobine — tout au moins dans le domaine étudié. L'explication est simple : l'hémoglobine étant plus soluble dans les solutions de sulfate

d'ammonium que ne l'est la sérumalbumine, la région de concentration saline pour laquelle l'hémoglobine donnerait un tel minimum correspond à des solutions sursaturées en sulfate d'ammonium et ne peut être étudiée en pratique.

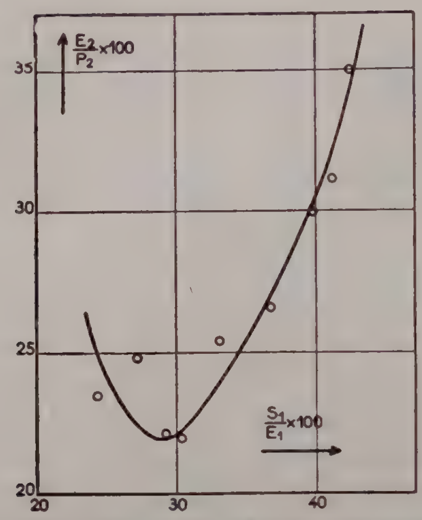


FIG. 7. — Étude des précipités de cristaux de sérumalbumine : variation du rapport pondéral eau/protéine évalué dans le précipité en fonction du rapport pondéral sel/eau évalué dans la liqueur mère en équilibre (ou surnageant).

Précipité cristallin et précipité amorphe.

La figure 8 représente la démixtion d'une série de systèmes contenant des pseudoglobulines, du sulfate d'ammonium et de l'eau. Cette fois-ci, la composition n'est constante pour aucun des trois constituants, mais elle varie linéairement. Pour des raisons pratiques, il est en effet beaucoup plus facile de préparer une série de systèmes en mélangeant en proportions variables la même solution aqueuse de protéine avec la même solution saline. Les points représentant les compositions des systèmes sont alors alignés sur le segment de droite joignant le point de l'axe des ordonnées représentant la solution aqueuse de protéine au point de l'axe des abscisses représentant la solution saline.

Les systèmes ont été obtenus en mélangeant une solution saturée de sulfate d'ammonium (environ 43 p. 100 de sel) avec une solution aqueuse de pseudoglobuline contenant, pour une première série, 11,8 p.100 de protéine et, pour une deuxième série presque dans le prolongement de la première, 12,2 p. 100 de protéine.

Ce diagramme obtenu avec des pseudoglobulines est en tout point comparable à celui étudié plus haut pour la sérumalbumine. Qu'il s'agisse de l'équilibre, avec une liqueur mère, de cristaux d'une protéine soigneu-

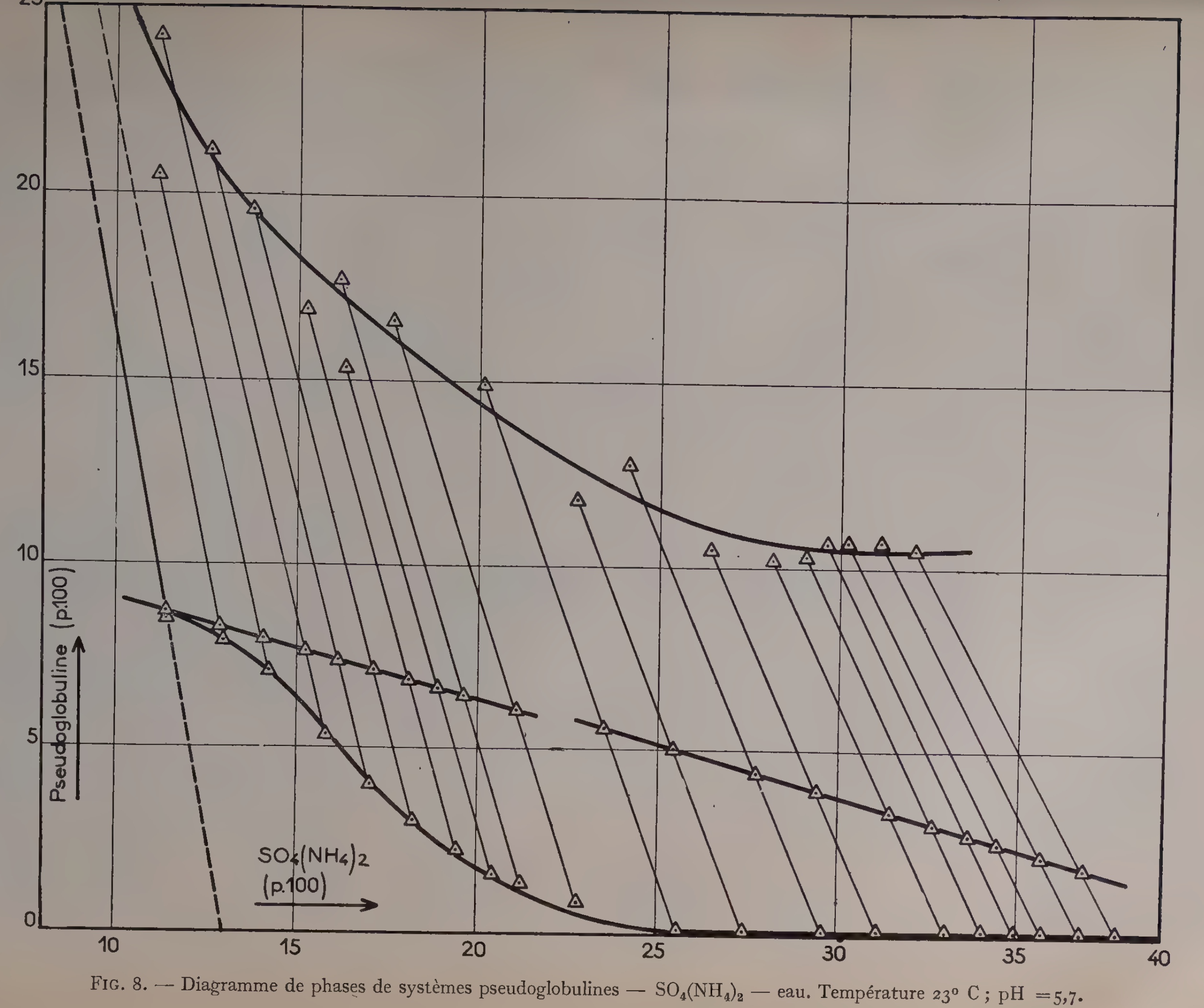


FIG. 8. — Diagramme de phases de systèmes pseudoglobulines — $SO_4(NH_4)_2$ — eau. Température 23° C ; pH = 5,7.

sement purifiée comme la sérumalbumine utilisée, ou qu'il s'agisse de l'équilibre, avec une solution surnageante, d'un précipité amorphe d'une protéine dont on connaît l'hétérogénéité, le phénomène de la démixtion a les mêmes caractéristiques. On ne trouve que des différences de détail : par exemple, l'intervalle de compositions salines correspondant au relargage est un peu plus large pour les pseudoglobulines que pour la sérumalbumine.

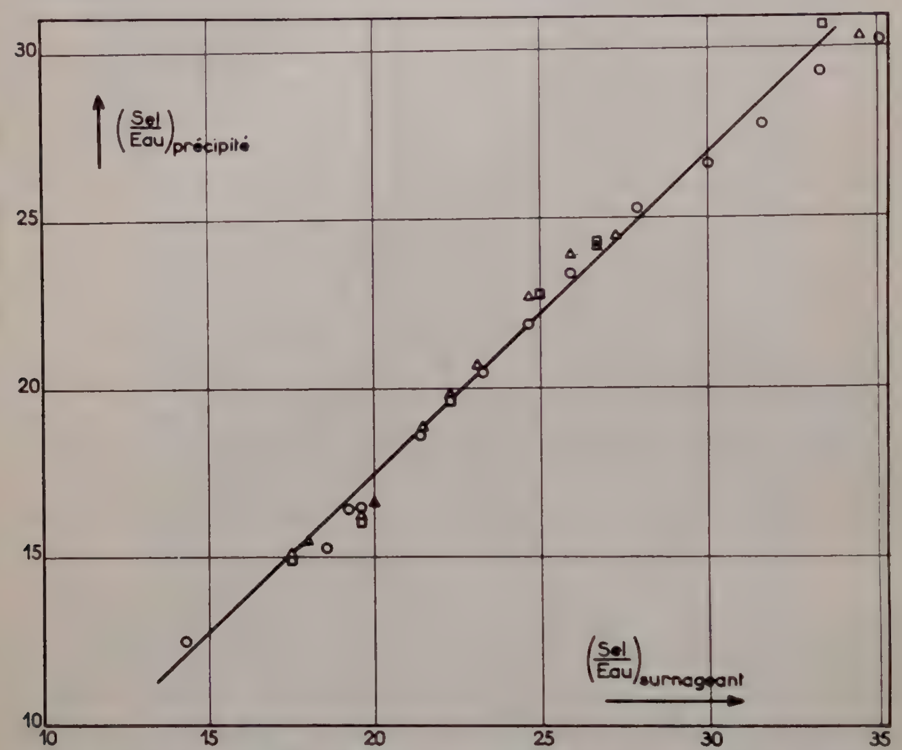


FIG. 9. — Étude du rapport pondéral sel/eau dans les précipités de *pseudoglobulines* en fonction de celui des surnageants en équilibre. Les points sont relatifs aux systèmes des figures 8 et 10.

En ce qui concerne la composition des précipités, nous nous sommes contenté de tracer les variations de concentration saline dans le précipité en fonction de celle du surnageant. La figure 9 est relative aux pseudoglobulines étudiées sur les diagrammes des figures 8 et 10. La figure 12 correspond aux euglobulines étudiées sur le diagramme de la figure 11.

Il est remarquable de constater comment les valeurs tirées des différents diagrammes tombent toutes sur les deux mêmes droites. Ainsi, la variation du rapport S_2/E_2, égal à la concentration saline dans l'eau des précipités, se trouve être linéaire comme avec le sérumalbumine cristallisée et ici également les pentes des droites sont légèrement inférieures à l'unité, ce qui correspond au fait que la concentration saline du précipité est inférieure à celle du surnageant.

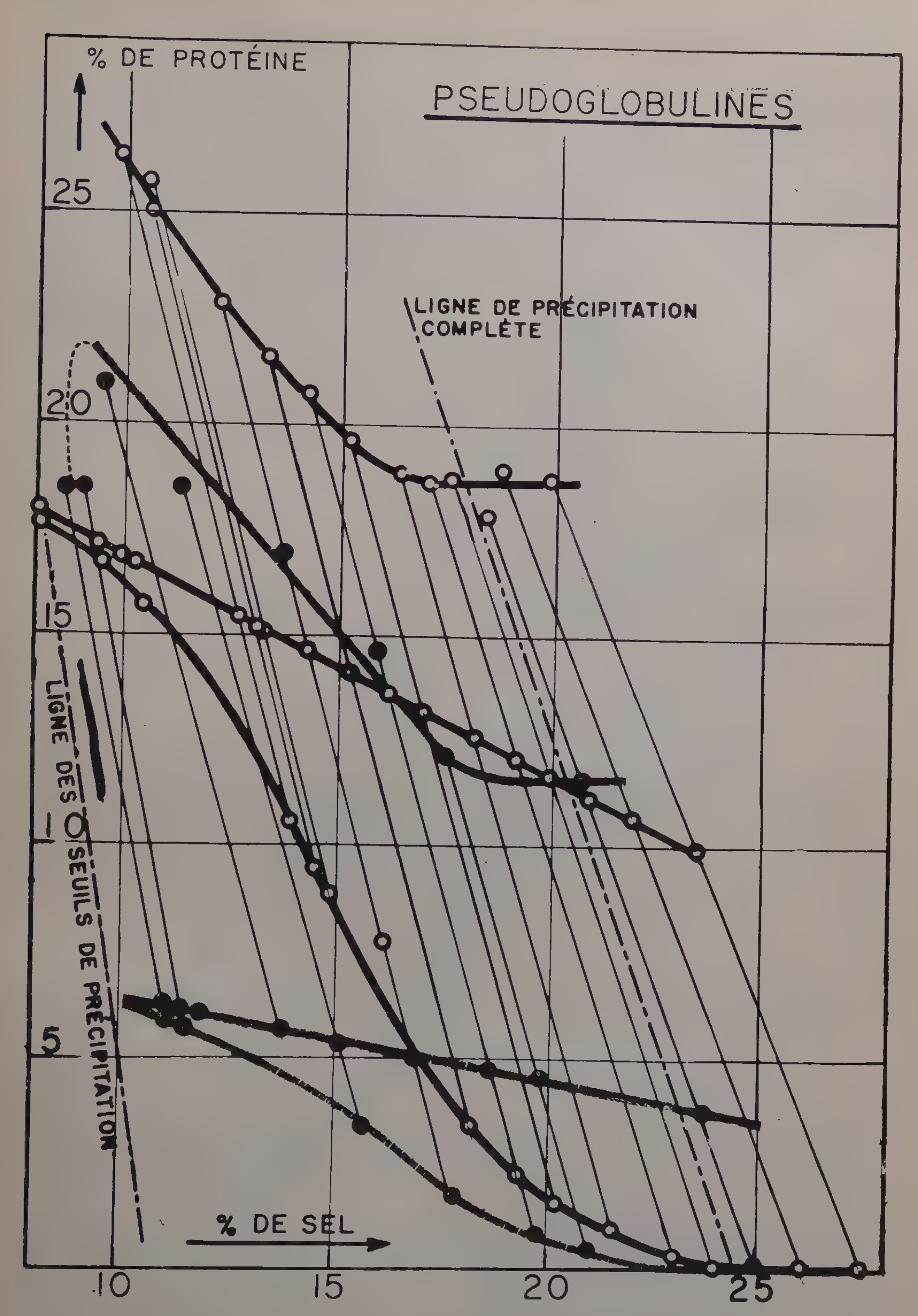


FIG. 10. — Diagramme de phases de systèmes pseudoglobulines — sulfate d'ammonium — eau. Deux séries de systèmes ont été représentées. Température : 23°C ; pH = 5,7.

Systèmes de même composition globale en sel.

On aurait pu préparer une série de mélanges de même composition globale en sel. En pratique on a opéré dans les mêmes conditions que pour la figure 8 (composition globale variant linéairement), mais en superposant cette fois-ci sur le même diagramme plusieurs séries linéaires.

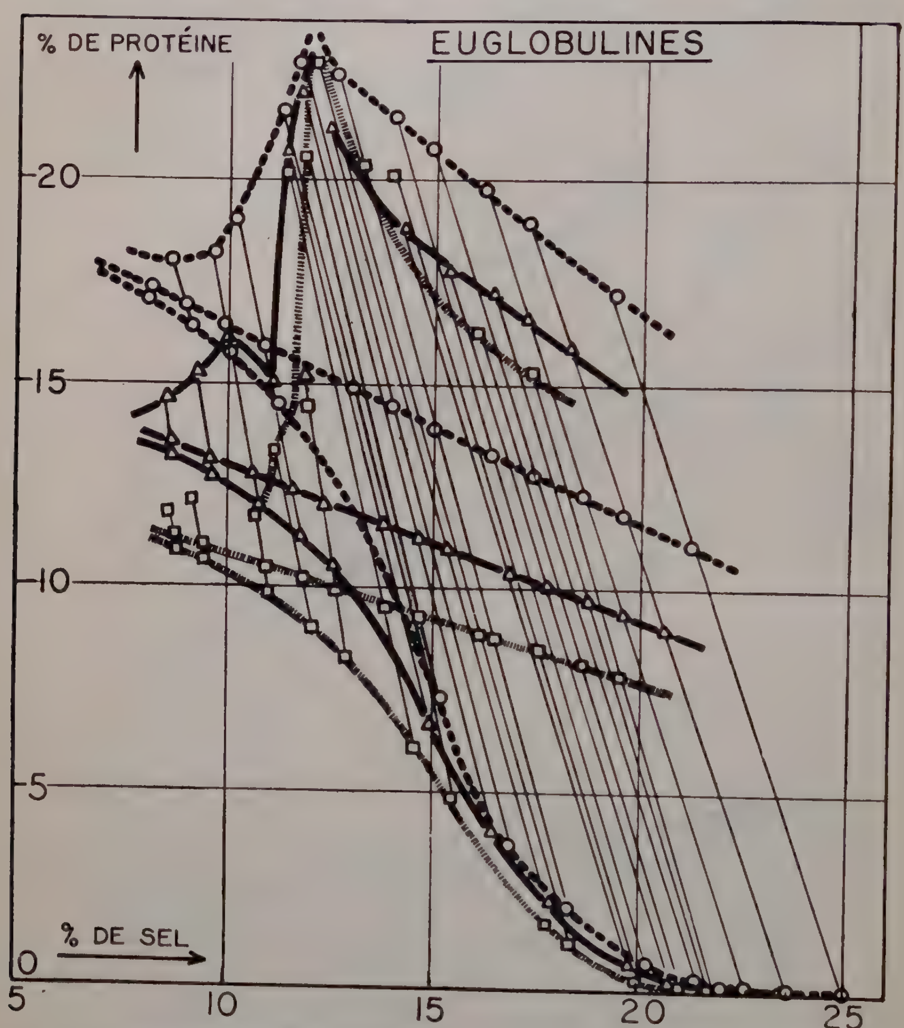


FIG. 11. — Diagramme de phases de systèmes euglobulines — sulfate d'ammonium — eau. Trois séries de systèmes ont été représentées. Température : 23°C ; pH compris entre 6,6 (début de la précipitation) et 5,6 (fin de la précipitation).

La figure 10 représente encore un diagramme relatif aux pseudoglobulines. Elle traduit la démixtion de deux séries distinctes obtenues en mélangeant une solution saturée de sulfate d'ammonium à une solution

aqueuse de pseudoglobulines contenant 22 p. 100 de protéine pour la première série, et 8,3 p. 100 pour la seconde.

De même, sur la figure 11, trois séries de systèmes ont été représentées. Elles correspondent à trois solutions mères d'euglobulines contenant toutes déjà 2 p. 100 de sulfate d'ammonium et respectivement 20 p. 100, 16 p. 100 et 12,2 p. 100 de protéine. Trois autres séries correspondant à des solutions mères de teneur en protéine plus faible ont été étudiées ; elles n'ont pas été représentées afin de ne pas surcharger la figure.

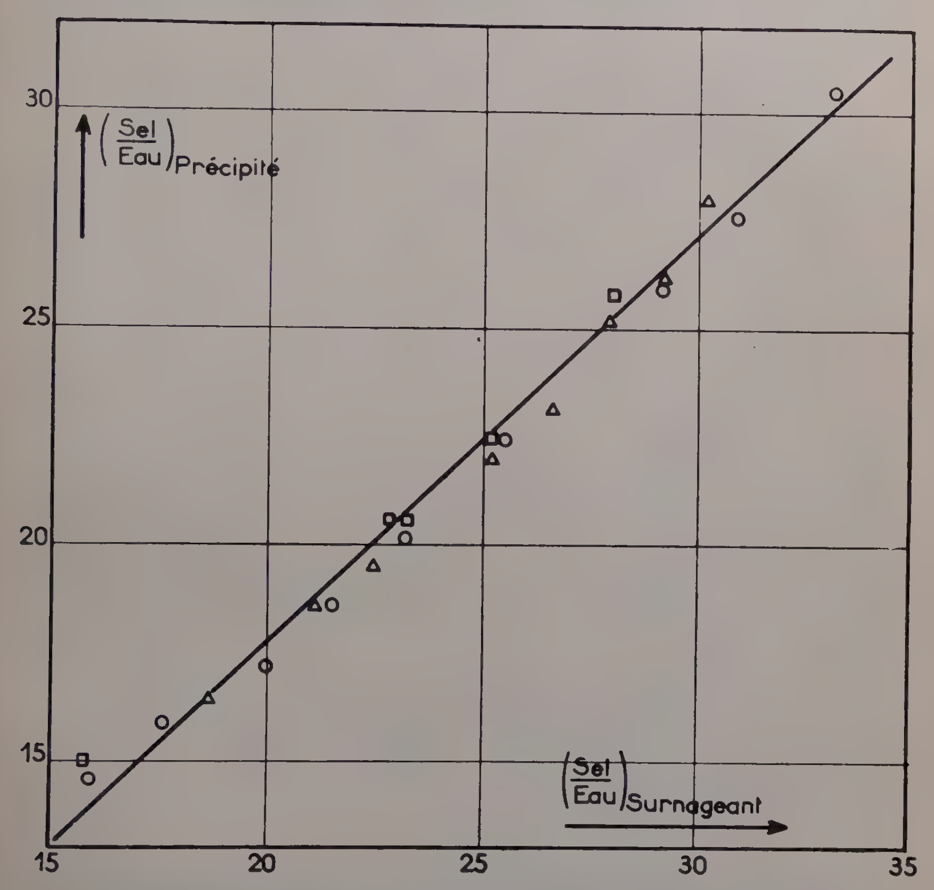


FIG. 12. — Étude du rapport pondéral sel/eau dans les précipités d'*euglobulines* en fonction de celui des surnageants en équilibre. Les points sont relatifs aux systèmes de la figure 11.

Ces deux diagrammes, bien que ne comportant pas de série de systèmes de même composition saline, permettent néanmoins de tirer des enseignements sur l'influence de la proportion globale de protéine.

Les courbes des précipités, d'une part, celles des surnageants d'autre part, sont placées respectivement dans le même ordre que les droites lieux des compositions des systèmes globaux. On serait donc tenté

de dire que les proportions de protéine dans chaque phase (dans les précipités comme dans les surnageants) sont d'autant plus grandes qu'il y a davantage de protéine dans les systèmes globaux. Mais ceci n'est vrai que pour des systèmes situés sur une même ligne de conjugaison. Si en effet on considère des systèmes de même composition saline (c'est-à-dire dont les points représentatifs sont sur une même verticale du diagramme) on constate que les compositions en protéine dans les surnageants ne sont pas forcément dans le même ordre que les concentrations globales en protéine. L'évidence de ce fait se dégagera par la suite.

Systèmes situés sur une même ligne de conjugaison.

Dans les diagrammes établis, les lignes de conjugaison forment un faisceau linéaire de droites qui convergent en un point éloigné de l'axe des ordonnées, ainsi que nous le verrons plus loin. Ces droites ne se coupent donc pas à l'intérieur du diagramme. Il est intéressant d'examiner les caractéristiques des systèmes situés sur une quelconque de ces lignes de conjugaison.

On constate que *deux systèmes dont l'un a son point représentatif sur la ligne de conjugaison de l'autre ont leurs lignes de conjugaison confondues. Autrement dit, lorsque la composition globale d'un système change de façon telle que son point représentatif se déplace sur une ligne de conjugaison, les points représentant les compositions des deux phases se déplacent sur la même ligne de conjugaison.*

De plus, pour une série de systèmes situés sur une même ligne de conjugaison, l'ordre des points représentant soit les précipités, soit les surnageants, est identique à celui des points donnant la composition globale des systèmes.

Enfin, nous verrons plus loin que les fractions protéiques restées dissoutes dans une série de surnageants dont les points représentatifs sont alignés sur la même ligne de conjugaison, donnent le même diagramme d'électrophorèse.

Limites de la zone de précipitation.

Le lieu des seuils de précipitation d'un échantillon de pseudoglobulines a été déterminé par néphélométrie. Le problème qui se posait était de trouver une définition au moins expérimentale du seuil de précipitation.

Nous avons procédé de la façon suivante. A partir d'une solution aqueuse de protéine de composition $c = 6{,}3$ p. 100, on a préparé 5 autres solutions mères plus diluées (fig. 13).

L'addition d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à chacune de ces 6 solutions de pseudoglobulines a été suivie par néphélométrie.

Sur la figure 14, on a porté la densité optique (par rapport à celle de l'eau), des mélanges en fonction du nombre de centimètres cubes de solution saturée de sulfate d'ammonium ajoutés à 20 cm³ de chacune des 6 solutions aqueuses de pseudoglobulines.

La densité commence par diminuer, par suite de la dilution par la solution saline, jusqu'au moment où l'agrégation des particules due à la présence du sel devient l'effet prédominant. Pour chaque nouvelle addition de solution saline, la densité optique décroît avec le temps par homogénéisation du mélange, ainsi que l'indiquent les flèches annexées aux

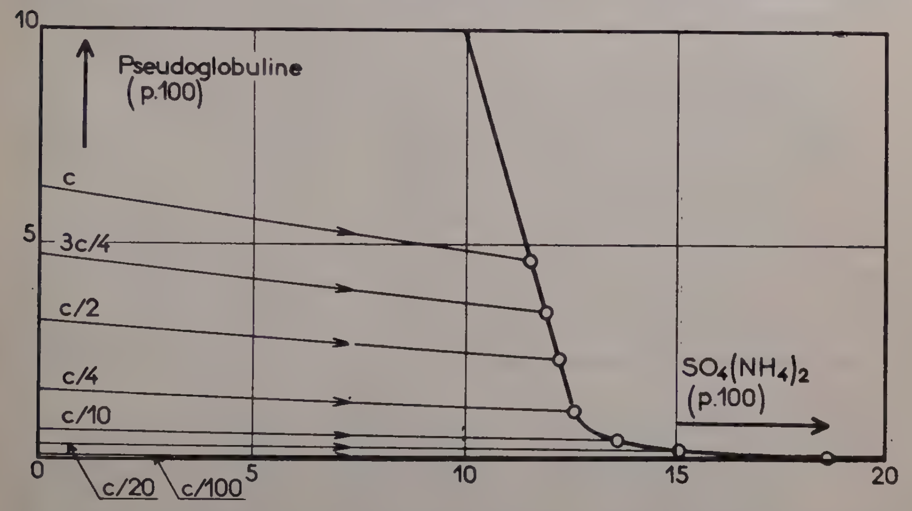


FIG. 13. — Lieu des seuils de précipitation de pseudoglobulines dissoutes dans une solution de sulfate d'ammonium (courbe de solubilité). A gauche de la courbe, les pseudoglobulines sont solubles ; le long de la courbe, leur solution est saturée ; à droite de la courbe, elles précipitent.

points expérimentaux. Enfin, pour une certaine proportion de sel, la densité optique se met au contraire à augmenter brusquement avec le temps lorsqu'on agite doucement le mélange (flèches dirigées vers le haut). Cette proportion est celle pour laquelle nous considérons que la précipitation débute. Cette définition intuitive mais conventionnelle présente l'avantage de permettre des déterminations relativement précises.

C'est ainsi qu'a été tracée la courbe de la figure 13.

On constatait déjà sur les diagrammes ternaires examinés plus haut et comportant plusieurs séries de systèmes (fig. 10 et 11) que les seuils de précipitation se plaçaient, en première approximation, sur une droite. La figure 13 vient confirmer le résultat pour des proportions de protéine plus faibles que sur les diagrammes. Cependant on voit qu'au dessous de 1 p. 100 de protéine, la courbe s'incurve pour se raccorder tangentiellement à l'axe des abscisses. Peut-être la cause de ce changement d'allure dans la courbe est-elle liée à la définition expérimentale choisie pour le

seuil de précipitation. Il est possible aussi que ce changement corresponde, dans la solution saline de protéine, à une modification physique dont il resterait à déterminer la nature.

Quoiqu'il en soit, *pour des compositions supérieures à 1 p. 100 de protéine, le lieu des seuils de précipitation est une droite qui a la propriété remarquable d'appartenir à la famille des lignes de conjugaison.*

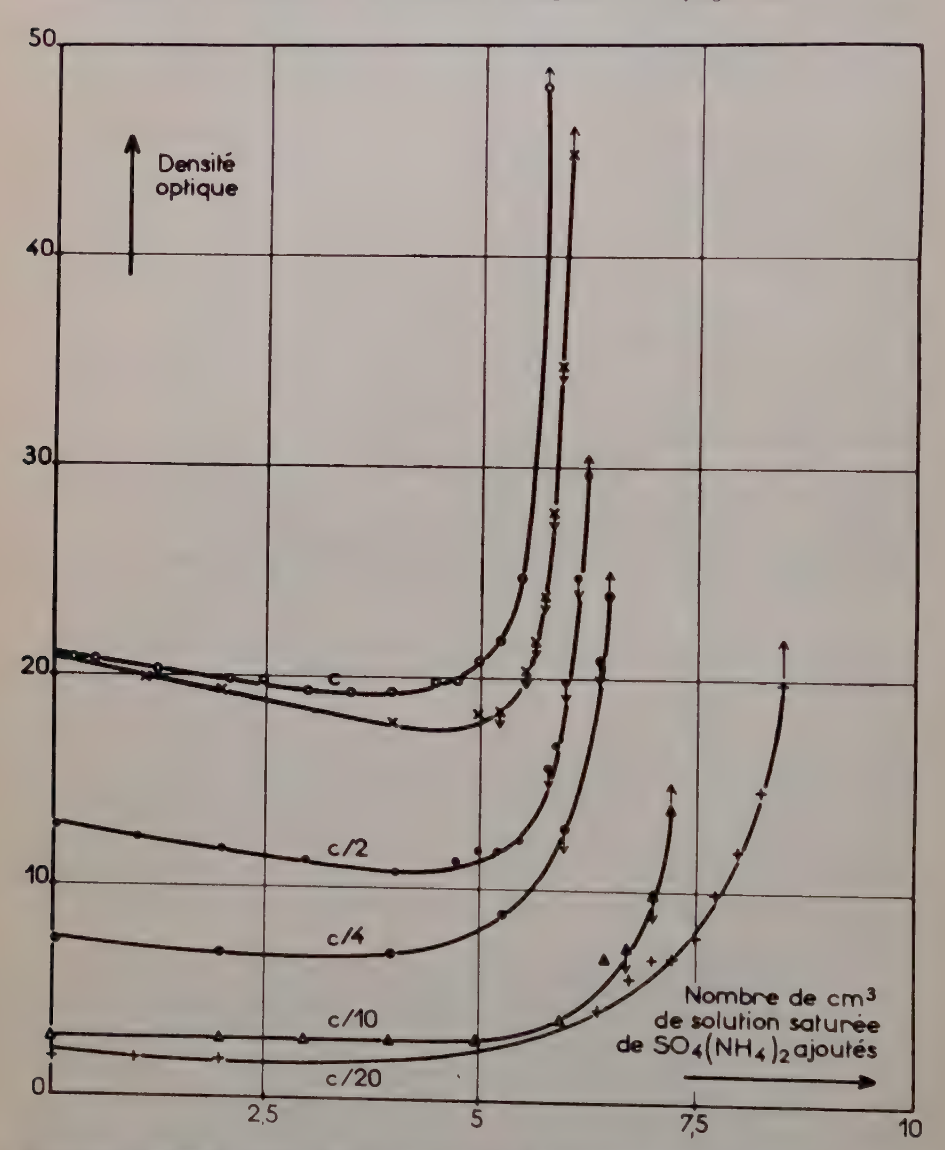


FIG. 14. — Courbes de densité optique ayant servi à la détermination des points expérimentaux de la figure 13. En abscisse : nombre de cm³ de $SO_4(NH_4)_2$ ajoutés progressivement à 20 cm³ de solution aqueuse de pseudoglobulines. — En ordonnée : densité optique (par rapport à l'eau) des mélanges successifs pour différentes concentrations de pseudoglobulines. — Les flèches indiquent le sens de variation de la densité optique en fonction du temps.

On arrive à la même conclusion pour la limite du diagramme au-delà de laquelle la protéine est intégralement précipitée, le surnageant en équilibre se réduisant alors à une solution saline : les figures 10 et 11 montrent que *les systèmes pour lesquels la composition en protéine s'annule dans le surnageant se trouvent sur une même ligne de conjugaison.* La limite en question est donc une droite appartenant aussi au faisceau des lignes de conjugaison.

Caractéristiques générales des diagrammes protéine-sel-eau étudiés.

On est ainsi conduit à distinguer plusieurs régions différentes dans les diagrammes protéine-sel-eau étudiés (fig. 15).

Au point de vue du nombre des phases, on peut distinguer trois zones.

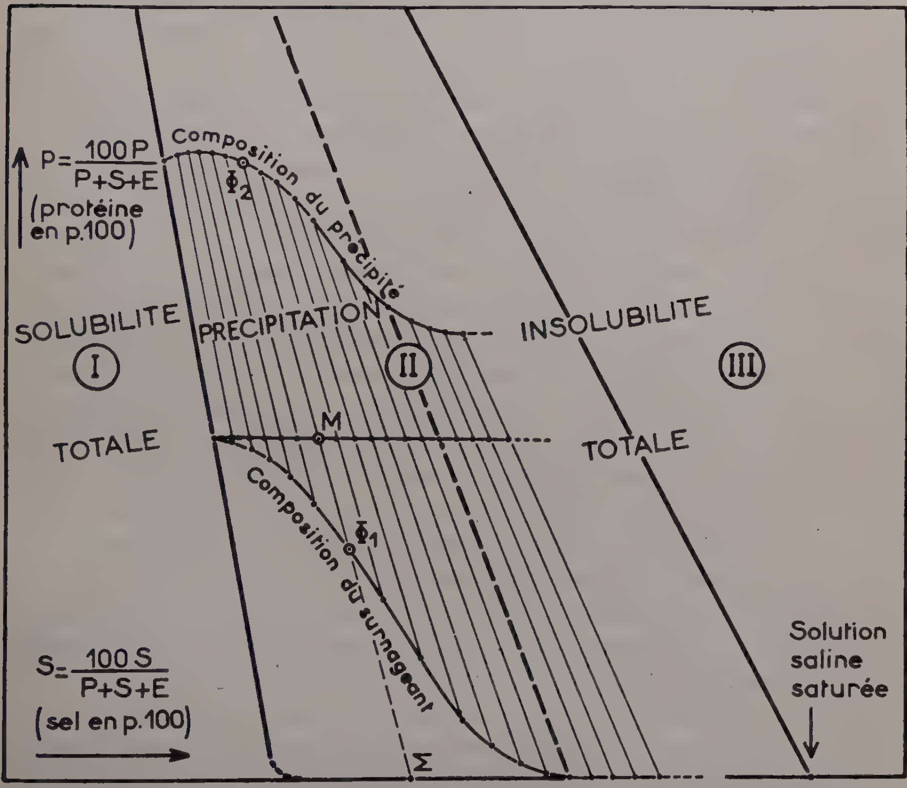


FIG. 15. — Schéma de l'aspect général des diagrammes de phases des systèmes protéine-sel-eau. — On a indiqué en chiffres romains le nombre de phases pour chaque domaine.

Dans la première, correspondant aux faibles teneurs en sel, la protéine est entièrement soluble et le système ne comporte qu'une phase.

Le cas des euglobulines est un peu plus compliqué : une zone supplémentaire intervient aux très faibles concentrations salines (moins de 0,5 p. 100 de sel) ; c'est une bande très mince du diagramme, limitée

par l'axe des ordonnées, et à l'intérieur de laquelle un précipité est en équilibre avec une solution. Nous laisserons de côté ce cas particulier.

La deuxième zone comporte des systèmes à deux phases : un précipité et un surnageant. Les compositions de ces deux phases sont variables et dépendent de celles des systèmes globaux dont elles proviennent.

Enfin, dans une troisième zone, trois phases sont en équilibre : la solution saline saturée, le sel cristallisé et un précipité contenant toute la protéine.

Précisons que nous n'avons pas étudié de systèmes contenant plus de 25 p. 100 de protéine, car la viscosité de tels systèmes est telle que la diffusion se trouve considérablement ralentie sinon arrêtée et les équilibres ne seraient atteints qu'au bout d'un temps très grand ou même infini. Si l'on ne peut donc, en toute rigueur, affirmer l'existence de ces trois zones au-dessus de 25 p. 100 de protéine, on voit d'après la forme des régions qu'une extrapolation vers les fortes concentrations en protéine serait tout à fait justifiée. Ceci est d'autant plus vraisemblable que la disposition des différents domaines d'existence des phases n'a rien d'insolite : on la retrouve dans différents diagrammes ternaires, comme par exemple ceux du type savon-sel-eau.

En ce qui concerne la composition des phases, la zone médiane (zone II) est de beaucoup la plus intéressante. On y distingue deux parties.

Dans la première, se produit la précipitation partielle et progressive. C'est le domaine du relargage au sens actif du mot. Le précipité et le surnageant en équilibre contiennent tous les deux les trois constituants, mais dans des proportions différentes. Seulement, *contrairenent à ce qu'on trouve dans les diagrammes ternaires classiques relatifs à trois constituants purs et bien définis, la composition de ces phases n'est pas représentée par une courbe unique.* Tout se passe comme si la protéine n'était pas un constituant unique. Ceci soulève le problème important du fractionnement, qui sera abordé plus loin.

Dans la deuxième partie de la zone II, la protéine est entièrement insoluble, et la phase liquide ne contient plus que deux des trois constituants : du sel et de l'eau.

Ces deux parties sont caractérisées par l'existence d'une famille bien définie de lignes de conjugaison, dont les propriétés remarquables vont nous apporter de précieux renseignements.

2. — Discussion.

Les travaux qui ont porté sur les équilibres de systèmes protéine-sel-eau sont relativement peu nombreux, mais fort intéressants. Il nous a paru opportun, au cours de cette discussion, de les analyser.

L'idée d'une étude des équilibres de phase des systèmes protéine-sel-eau est fort ancienne. On trouve dès 1905 un travail de GALEOTTI (4) dont le titre exact : *Ueber die Gleichgewichte zwischen Eiweisskörper und Electrolyten* ; I *Mitteilung* : *Gleichgewichte im System Eieralbumin, Ammoniumsulfat, Wasser*, indique déjà clairement les conceptions de l'auteur.

Travaux de Spiro.

Auparavant, SPIRO (9) étudie la précipitation de la caséine et de la gélatine par le sulfate de sodium. Il est le premier à considérer comme des *phases* les deux parties du système qui se séparent, et à noter que celles-ci contiennent toutes les deux de la protéine, l'une étant riche en protéine et l'autre pauvre.

Bien mieux, il remarque que, par élévation de la température, la phase inférieure, c'est-à-dire le précipité, devient liquide de sorte qu'on a un équilibre entre deux phases liquides, équilibre que BUNGENBERG DE JONG croira devoir qualifier plus tard par le terme de coacervation (10). D'ailleurs, SPIRO compare tout de suite la précipitation de la caséine par le sulfate de sodium à la précipitation des sels par l'alcool dans les systèmes alcool-sel-eau : dans ce cas également, on peut en effet observer une séparation en deux phases liquides.

En résumé, SPIRO distingue des phases dont il étudie la composition, mais ne cherche pas à relier celle-ci avec celle des systèmes globaux. Il note l'analogie avec des systèmes ternaires classiques, mais ne trace pas de diagrammes.

Travaux de Galeotti.

GALEOTTI (4, 11, 12, et 13) le premier utilise la représentation sur un diagramme triangulaire pour l'étude des systèmes protéine-sel-eau. Il constate que la précipitation est un phénomène réversible.

Mais il commet deux erreurs. D'abord, il considère *a priori* les cristaux comme correspondant à une substance pure, comme ce serait le cas pour des cristaux de chlorure de sodium (4). Ensuite, se fondant sur une mesure et une seule, malheureusement erronée, il conclut que les cristaux sont formés par de l'albumine pure et ne contiennent ni sel ni eau.

Partant de l'idée que l'albumine est un corps pur, il cherche à déterminer la courbe isotherme donnant la composition de la liqueur mère en équilibre avec les cristaux et pense *a priori* que cette courbe est unique (comme ce serait évidemment le cas avec trois constituants purs).

Il emploie deux méthodes pour tracer cette courbe (fig. 16).

La première (« méthode analytique ») consiste à mettre une liqueur mère en équilibre avec des cristaux, faire un prélèvement sur la liqueur mère pour en déduire la composition (ce qui donne un premier point de la courbe), ajouter de l'eau et du sel au reste des deux phases, refaire un prélèvement sur la liqueur mère pour l'analyser (ce qui donne un deuxième point de la courbe) et ainsi de suite.

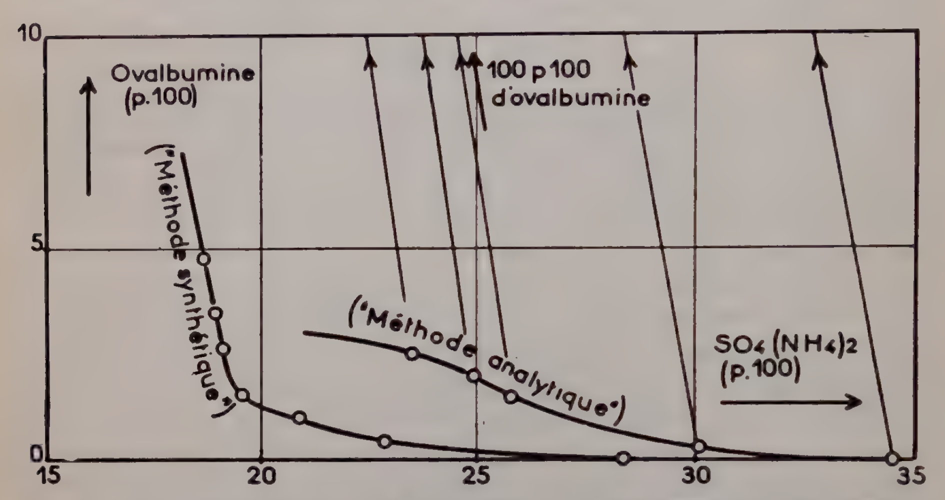


FIG. 16. — Courbes tracées d'après des résultats expérimentaux de GALEOTTI (4) pour des systèmes ovalbumine-sulfate d'ammonium-eau. La courbe dite de la « méthode synthétique » est analogue au lieu des seuils de précipitation de la figure 13. Celle de la « méthode analytique » est comparable à une courbe des surnageants (fig. 3, 8, 10 et 11).

La deuxième méthode (« synthétique ») consiste à déterminer la limite du diagramme au-delà de laquelle apparaissent les cristaux. La façon dont nous avons, pour notre part, déterminé le seuil de précipitation des pseudoglobulines (fig. 13) est tout à fait comparable à celle de GALEOTTI. Et la courbe que nous obtenons présente la même allure que celle donnée par cet auteur.

Si on prend la peine de tracer sur un même diagramme (fig. 16) les deux courbes ainsi obtenues par GALEOTTI, on constate qu'elles sont complètement différentes l'une de l'autre, aussi bien par leur forme que par leur position, ce dont GALEOTTI n'a tiré aucune conclusion.

Si la courbe obtenue par la deuxième méthode est bien le lieu des seuils de précipitation, celle fournie par la première méthode rappelle par son allure ce que nous avons appelé, sur nos diagrammes, « courbe des surnageants ».

Le fait que ces deux courbes soient distinctes prouve à lui seul que l'ovalbumine n'est pas un constituant pur. Cette contradiction de GALEOTTI est à l'origine de la controverse ouverte par V. HENRI (14).

Travaux de Chick et Martin.

En 1913, CHICK et MARTIN publient une étude sur la précipitation de l'ovalbumine par le sulfate d'ammonium (5). Ils opèrent donc avec les trois mêmes substances que GALEOTTI dont ils semblent ignorer les travaux. Ils reprennent l'idée de SPIRO d'une séparation de phases comparable à celle des systèmes alcool-sel-eau, et étudient l'influence de la composition globale des systèmes : la teneur en protéine du filtrat (c'est-à-dire de la liqueur mère) diminue avec une proportion croissante de sel dans le mélange global ; la quantité de protéine précipitée par rapport à la protéine totale présente dans le système augmente avec la proportion de protéine présente dans le mélange global. Cette dernière remarque avait d'ailleurs déjà été faite par KAUDER (15) et HOFMEISTER (16).

En outre, CHICK et MARTIN notent que si on change la proportion de l'un des trois constituants dans l'une des deux phases, la composition des deux phases ainsi que leur masse changent. Mais ils se bornent à cette observation qualitative et ne précisent pas dans quelle mesure la composition des phases dépend de celle du système global.

Travaux de Sörensen.

Peu de temps après eux, SÖRENSEN et HÖYRUP entreprennent une série d'études sur l'ovalbumine cristallisée avec le sulfate d'ammonium. Ils se préoccupent de la composition des cristaux, mais partent visiblement d'un point de vue moins rigoureux que les précédents auteurs. C'est ainsi que SÖRENSEN ne semble pas fixé sur la notion de phase, considérant une solution de protéine tantôt comme un système à une phase, tantôt comme un système à deux phases.

SÖRENSEN et HÖYRUP étudient un certain nombre de précipités cristallins en équilibre avec des solutions mères (17). Les valeurs expérimentales qu'ils donnent sont suffisamment précises pour que nous ayons pu les traduire sur un diagramme (fig. 17). On retrouve une grande similitude avec les diagrammes que nous avons obtenus nous-même. Malheureusement, ces auteurs ne tirent pas la leçon du travail de CHICK et MARTIN, car ils ne précisent pas la composition globale des systèmes en équilibre.

Dans une autre partie de leur étude (18) ils examinent pourtant l'influence de la composition globale en protéine sur celle de la liqueur mère et croient pouvoir en conclure — comme le croyait GALEOTTI — que la courbe donnant la composition de cette solution mère est unique, comme si la proportion globale de protéine n'intervenait pas. L'analyse des liqueurs mères leur donne des concentrations en « hydrate de pro-

téine » qui ne variaient en effet qu'entre 0,768 et 0,597 g pour 100 g d'eau libre. Or d'une part ils se sont placés à une concentration saline où la presque totalité de la protéine est précipitée. Les diagrammes des figures 3,

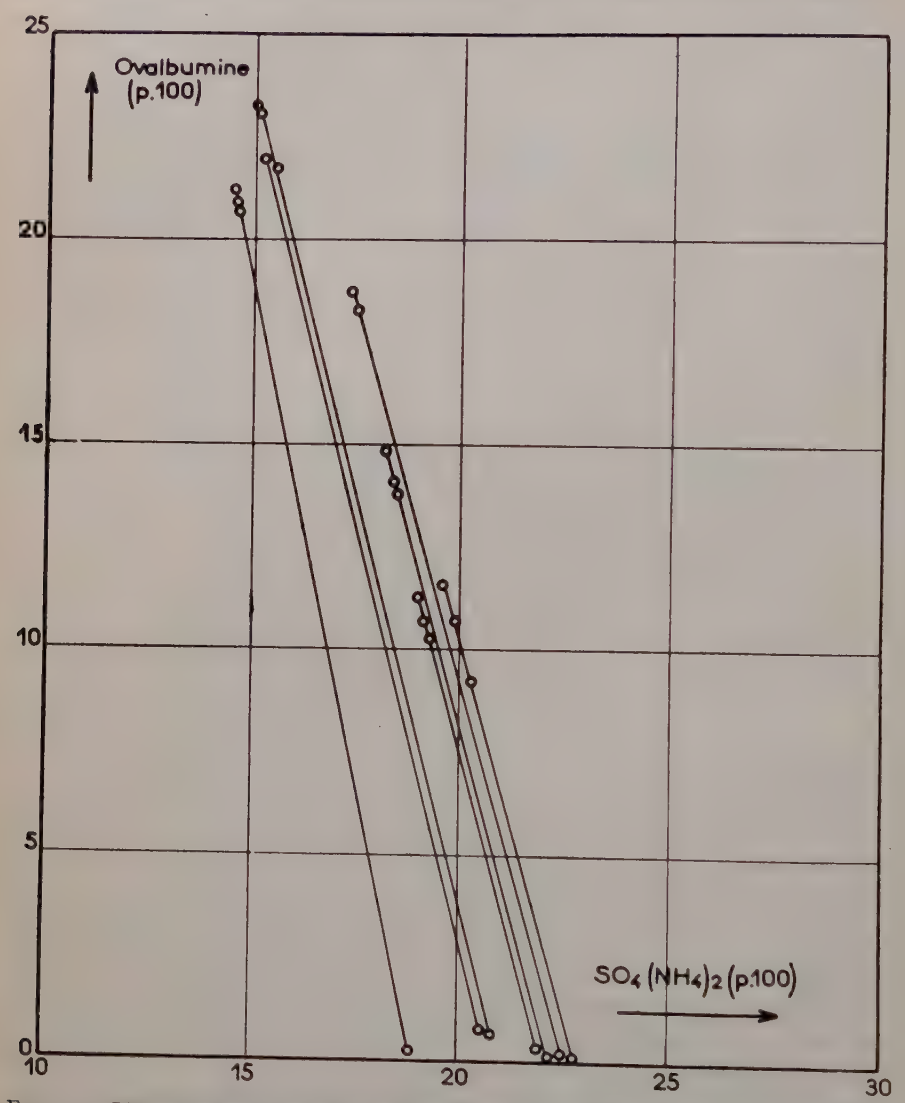


FIG. 17. — Diagramme partiel tracé d'après les chiffres de SÖRENSEN et HÖYRUP (17) pour des systèmes ovalbumine-sulfate d'ammonium-eau. Les précipités ont été analysés par SÖRENSEN en 2 ou 3 exemplaires. Les compositions des systèmes globaux ne sont pas connues.

8, 10 et 11 montrent précisément qu'aux fortes concentrations salines les courbes des surnageants tendent à se confondre, de sorte que, dans cette région, les écarts de concentration sont bien de l'ordre de grandeur trouvé par SÖRENSEN et HÖYRUP ou même plus faibles. D'autre part,

bien que faibles en valeur absolue, les écarts des valeurs indiquées correspondent en fait à une différence relative de 25 p. 100 dans le cas cité par ces auteurs.

Cette dernière critique sur le travail de Sörensen n'est pas nouvelle. Des résultats analogues publiés par Sörensen en 1918 (19) avaient donné lieu à de vives objections : en 1927, Ostwald et Köhler (7), discutant les conclusions de Sörensen, montrent en particulier que ses résultats expérimentaux démentent ses propres conclusions en ce qui concerne l'influence de la composition globale en protéine sur celle de la liqueur mère.

Travaux d'Ostwald et Köhler.

Dans le même article, Ostwald et Köhler publient une étude sur la démixtion des systèmes gélatine-acide sulfosalicylique-eau, systèmes qui ont l'avantage remarquable de se séparer en deux phases liquides, par conséquent faciles à séparer. Un tel choix élimine la complication due à la difficulté de séparer intégralement une des deux phases de l'autre (précipité imbibé par la solution mère en équilibre).

Ces auteurs sont les premiers — et les derniers aussi — à publier des résultats grâce auxquels on connaît toutes les conditions des équilibres étudiés, aussi bien la composition globale des systèmes que celle des phases séparées. Cependant, ils ne représentent graphiquement que les variations des proportions de gélatine dans les phases et des proportions d'acide sulfosalicylique dans les phases en fonction de la concentration globale en acide sulfosalicylique. Leurs conclusions, très intéressantes, tendent à mettre en évidence les différences entre de tels systèmes et les systèmes ternaires classiques. Résumons-les.

Les deux courbes donnant les compositions des deux phases en équilibre ont des positions qui dépendent de la composition globale des systèmes ; autrement dit ces courbes ne sont pas uniques. Ces mêmes courbes sont distinctes de celle qui limite la zone de démixtion en deux phases liquides sur un diagramme ternaire.

Comme Ostwald et Köhler se sont interdit de réunir sur un diagramme ternaire leurs résultats, les analogies avec les systèmes ternaires classiques leur passent inaperçues.

Si on porte en effet leurs résultats sur un diagramme ternaire (fig. 18,) analogue à ceux que nous avons déjà établis, on constate que tout système dont le point représentatif est situé sur la ligne de conjugaison relative à un autre système a sa ligne de conjugaison confondue avec celle de l'autre système.

On ne comprend pas pourquoi, dans leurs conclusions finales, Ostwald et Köhler déclarent « qu'il est impossible de tracer les lignes

de conjugaison parce que les points représentant les compositions des phases ne tombent pas sur la courbe délimitant la zone de démixtion ».

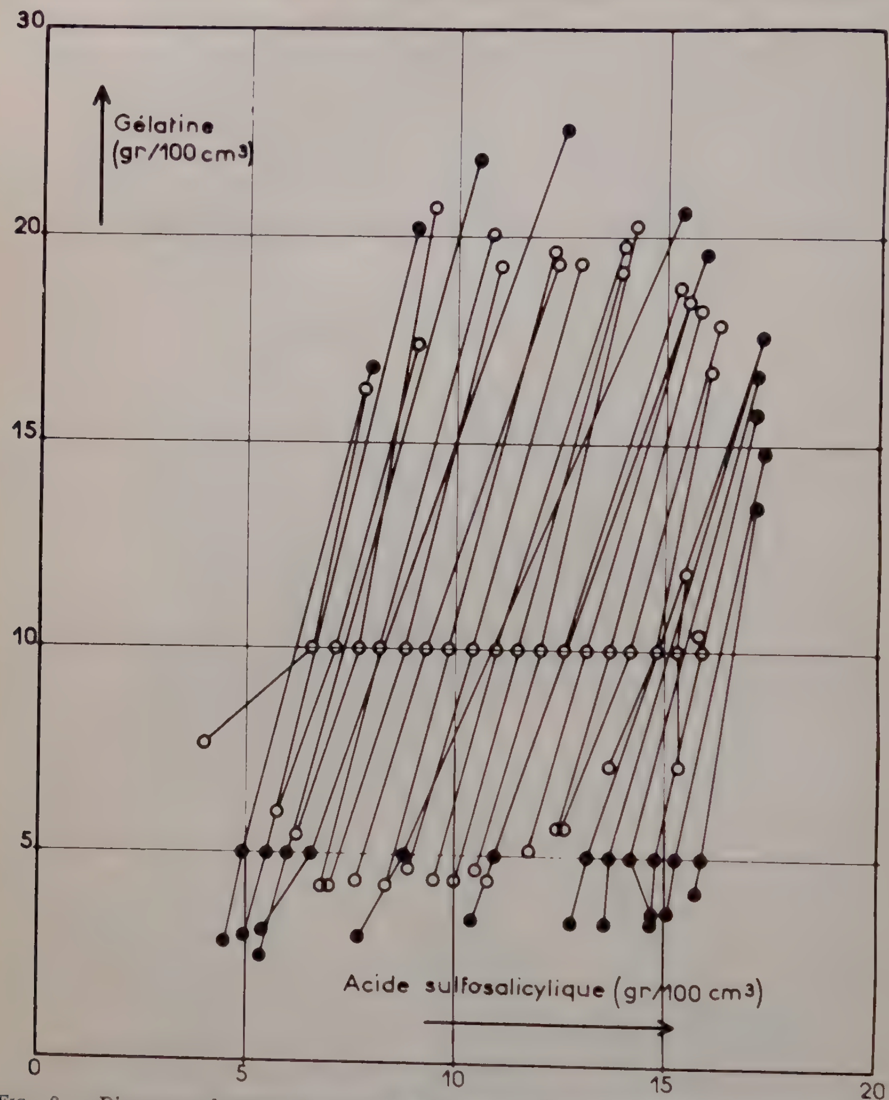


Fig. 18. — Diagramme de phases de systèmes gélatine-acide sulfosalicylique-eau, d'après les chiffres d'Ostwald et Köhler (7). Ces auteurs ayant fait des déterminations en volume et non en masse, on a dû tracer le diagramme en supposant que les mélanges et les phases avaient même densité. Deux séries de systèmes ont été représentées : la première correspond à une composition globale en gélatine de 10 g pour 100 cm³ (points blanc) ; la deuxième à 5 g de gélatine pour 100 cm³ (points noirs). Les lignes de conjugaison brisées correspondent à des erreurs de mesures.

Ceci mis à part, il n'en reste pas moins que les conclusions auxquelles nous avons abouti avec les systèmes protéine-sel-eau concordent avec celles que l'on peut tirer de cette étude sur les systèmes gélatine-acide sulfosalicylique-eau.

Travaux de Mc Bain.

En 1930, Mc Bain et Jameson (20) publient un diagramme de phases des systèmes globulines-sulfate d'ammonium-eau ; ce diagramme a l'inconvénient d'être difficilement lisible et presque totalement dépourvu de commentaires. On y distingue les limites séparant les différentes zones du diagramme ainsi que quelques lignes de conjugaison. Avec une intuition admirable, Mc Bain insiste sur tout le fruit qui résulterait d'une comparaison entre les savons et les protéines. Mais ce travail reste sans suite, et la tentative de Jameson (21) en 1938, sur les protéines sériques dénote des préoccupations d'un tout autre ordre.

Travaux de Dervichian.

Ce n'est ensuite qu'en 1947 que la question est reprise par Dervichian et ses collaborateurs.

Dervichian et Magnant (22) étudient d'abord l'influence de divers facteurs susceptibles d'intervenir dans la formation de deux phases liquides (coacervation) à partir de systèmes contenant des protéines. Ils étendent le problème à diverses substances colloïdales autres que les protéines. Puis Magnant (23) examine du point de vue structural les phases ainsi séparées et Dervichian et Van den Berg (24) précisent les domaines d'existence des phases dans les systèmes gélatine-sulfate d'ammonium-eau.

En 1949, Dervichian (25) reprend l'idée de Mc Bain d'une comparaison entre les systèmes à base de savons et ceux à base de protéine ; il la généralise et met en évidence l'unité de comportement de tous les systèmes contenant au moins un constituant colloïdal. Enfin il dégage l'analogie — déjà suggérée par Spiro — entre les systèmes ternaires à base de protéine et les systèmes ternaires classiques (26) et montre sous un nouvel aspect la continuité entre les solutions ordinaires et les solutions colloïdales.

Au terme de cette analyse, il est intéressant de noter que la plupart des erreurs et des lacunes que l'on peut relever dans les travaux antérieurs à 1940 proviennent de l'idée *a priori* que les systèmes colloïdaux échappent aux lois ordinaires de la chimie. Au contraire, toutes les conclusions qui demeurent valables militent en faveur de l'idée opposée.

3. — Conclusions.

En résumé, nous avons établi pour la première fois et de façon systématique des diagrammes ternaires rassemblant avec rigueur et concision les caractéristiques des équilibres des systèmes protéine-sel-eau. La discussion qui précède a montré combien le fait de disposer de tels diagrammes facilite la compréhension des phénomènes.

Le rôle des différents paramètres intervenant dans ces équilibres a été étudié, notamment celui des compositions centésimales des systèmes en sel et en protéine, ainsi que celui des rapports de deux des trois quantités protéine, sel et eau, évalués dans le système global ou dans les phases séparées.

Dans les diagrammes tracés, on a été conduit à mettre en évidence et à délimiter différents domaines en ce qui concerne le nombre des phases, d'une part, et le phénomène du relargage, d'autre part.

La zone de précipitation proprement dite est caractérisée par une famille de lignes de conjugaison qui constituent l'élément le plus important des diagrammes.

Au moyen des équilibres avec membrane, nous allons maintenant voir s'élargir le domaine dans lequel on peut tracer les lignes de conjugaison, ce qui nous permettra de confirmer leur convergence et d'en expliquer la signification physique.

Chapitre III

ÉQUILIBRE DES SYSTÈMES PROTÉINE-SEL-EAU AVEC MEMBRANE EAU LIÉE AUX PROTÉINES EN SOLUTION

Les équilibres des systèmes protéine-sel-eau vont être envisagés dans le cas où, par l'artifice d'une membrane divisant les systèmes en deux parties (système intérieur et système extérieur), on empêche la protéine de diffuser dans l'une de ces deux parties.

Dans le présent chapitre, nous nous bornerons à étudier les compositions globales de chacun de ces systèmes partiels en équilibre de part et d'autre de la membrane, sans nous occuper de la composition des différentes phases que peut comporter le système intérieur. La même représentation graphique que précédemment, sur des diagrammes ternaires, sera utilisée. Comme la composition du système global (formé

par l'ensemble des deux systèmes partiels intérieur et extérieur) ne présente pas d'intérêt, elle ne sera pas figurée. Chaque équilibre avec membrane sera donc représenté par un couple de points correspondant aux deux parties.

Par analogie avec les diagrammes de phases, nous appellerons *lignes de conjugaison* les segments joignant les points de chacun de ces couples. Nous verrons d'ailleurs que cette analogie n'est pas seulement formelle, car l'expérience nous démontrera l'identité de ces lignes de conjugaison relatives aux équilibres avec membrane avec celles des diagrammes de phases. Mais ceci sera l'objet d'un chapitre ultérieur.

1. — Résultats expérimentaux.

Convergence des lignes de conjugaison dans les équilibres de phases.

Un simple coup d'œil sur les diagrammes que nous venons d'étudier montre que l'ensemble des lignes de conjugaison forme une famille de droites convergentes.

Il est remarquable de constater que ces lignes passent toutes par un même point de l'axe des ordonnées des diagrammes.

On s'en rend compte en calculant, pour chaque ligne de conjugaison, la valeur π de son ordonnée à l'origine et en portant l'ensemble de ces valeurs sur un graphique en fonction de l'abscisse Σ des points d'intersection de ces lignes de conjugaison avec l'axe des abscisses. Les figures 19

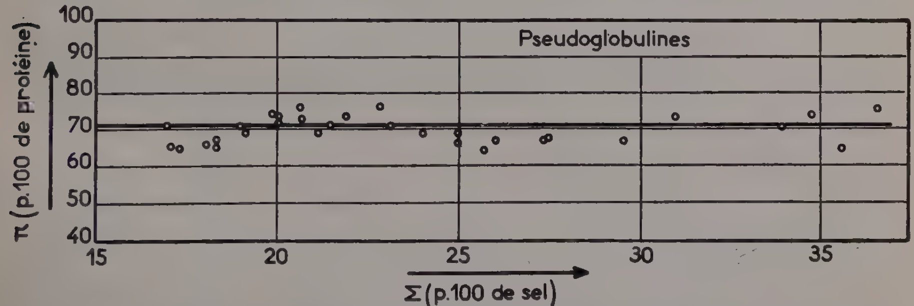


FIG. 19. — Étude de la convergence des lignes de conjugaison dans les diagrammes de phases des systèmes pseudoglobulines-$SO_4(NH_4)_2$-eau valeurs des ordonnées à l'origine des lignes de conjugaison en fonction de leurs abscisses à l'origine.

et 20, relatives aux systèmes contenant des pseudoglobulines et des euglobulines représentés respectivement sur les figures 10 et 11, montrent qu'on obtient une horizontale. En première approximation, les valeurs de π sont donc indépendantes de Σ.

Pour les pseudoglobulines, on trouve $\pi = 70 \pm 5$ (p. 100).

Pour les euglobulines $\pi = 72 \pm 5$ (p. 100).

La dispersion des points en un nuage sous forme d'une bande horizontale s'explique facilement, étant donné la manière dont on a obtenu les valeurs de π. Chaque ligne de conjugaison est, en effet, déterminée par deux points expérimentaux M et Φ_1 (fig. 2 et 15) et il s'agit de déterminer son intersection avec l'axe des ordonnées. Or, sur une ligne de conjugaison donnée, ce point d'intersection est très éloigné de M et de Φ_1. Aussi une faible erreur sur la position de M ou de Φ_1 entraîne-t-elle

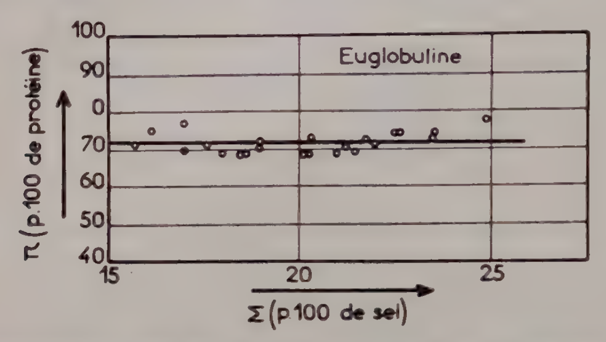


FIG. 20. — Étude de la convergence des lignes de conjugaison dans les diagrammes de phases des systèmes euglobulines-$SO_4(NH_4)_2$-eau valeurs des ordonnées à l'origine des lignes de conjugaison en fonction de leurs abscisses à l'origine.

une erreur beaucoup plus importante sur la valeur de π, d'autant plus que les angles des lignes de conjugaison avec l'axe des ordonnées sont relativement petits.

Il était donc important de pouvoir étudier ce faisceau de lignes de conjugaison dans des conditions plus précises. Le procédé que nous avons mis au point consiste à étudier les équilibres protéine-sel-eau en astreignant les systèmes à comporter deux parties distinctes séparées par une membrane imperméable à l'un des trois constituants, en l'occasion la protéine.

On immerge au sein d'une solution saline une solution aqueuse de protéine enfermée dans un sac à dialyse de volume petit par rapport à celui de la solution saline.

Ainsi que nous allons le voir, on peut alors jouer sur deux paramètres principaux : la concentration de la solution saline extérieure et la concentration de la protéine dans le sac.

Équilibres à concentration saline extérieure variable.

Une première série d'expériences a été réalisée dans les conditions suivantes.

Des sacs identiques initialement, d'une capacité de 5 cm³ environ, ont été remplis chacun de 5 cm³ d'une solution aqueuse de sérumalbu-

mine de bœuf à 5 p. 100 et immergés dans des solutions de sulfate d'ammonium de concentration variant de 2 à 30 p. 100, à raison d'environ 1 litre de solution saline par sac.

Les résultats de l'analyse à l'équilibre sont réunis sur la figure 21. La représentation est la même que pour les diagrammes de phases. Pour chaque système — un système étant formé par l'ensemble en équilibre : contenu du sac + solution saline extérieure — on a porté sur le graphique d'une part la composition de la solution saline extérieure à laquelle correspond un point de l'axe des abscisses ; d'autre part la composition globale de la partie du système intérieure au sac, que le boudin contienne une ou deux phases.

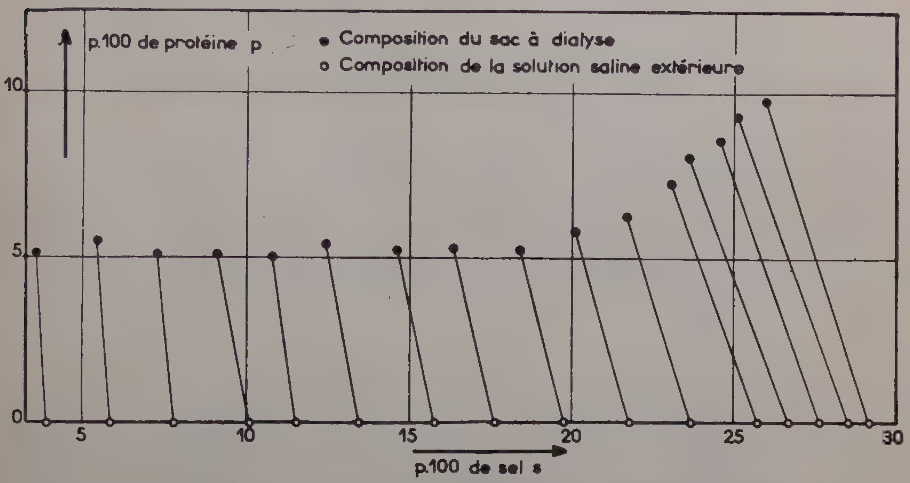


FIG. 21. — Diagramme relatif à des équilibres avec membrane des systèmes sérumalbumine (bœuf)-$SO_4(NH_4)_2$-eau. Température : 23°C ; pH = 5,2. Tous les sacs ont même taille et contiennent la même quantité de protéine.

Les points des couples ainsi obtenus sont réunis par des lignes de conjugaison.

Dans des conditions comparables, et sur lesquelles nous reviendrons plus loin, une deuxième série d'équilibres a été réalisée avec des solutions salines extérieures de composition variant de 1 à 43 p. 100 de sulfate d'ammonium, c'est-à-dire jusqu'à la saturation en sel (fig. 22).

La représentation simplifiée que nous avons adoptée pour les deux dernières figures ne précise pas le nombre ni la composition des phases de la partie du système intérieure au sac à dialyse.

On constate que pour des proportions de sel inférieures à 24 p. 100 dans la solution extérieure, le sac ne contient qu'une phase constituée par une solution. On se trouve donc dans la zone de solubilité totale de la protéine utilisée. De 24 à 30 p. 100 de sel extérieurement, le sac contient deux phases, un précipité et un surnageant. Au-delà de 30 p. 100

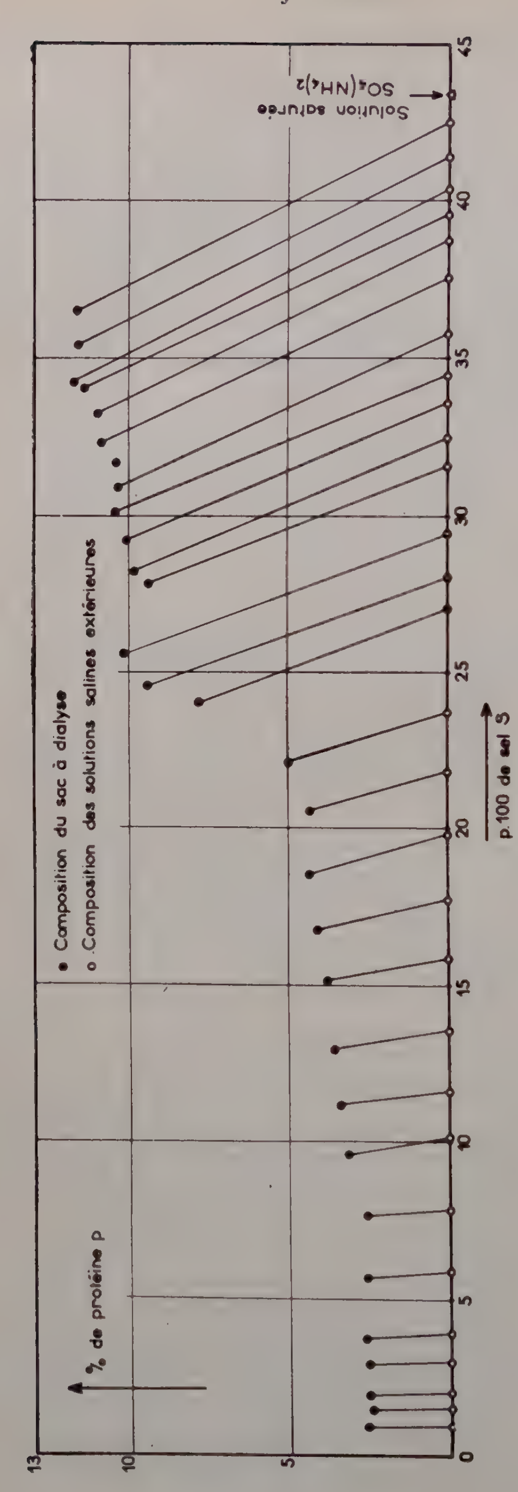


FIG. 22. — Diagramme relatif à des équilibres avec membrane des systèmes sérumalbumine (bœuf)-$SO_4(NH_4)_2$-eau. Température : 23°C ; pH = 5,2. La taille des sacs ainsi que la quantité de protéine qu'ils contiennent est différente suivant les domaines de concentration saline extérieure.

de sulfate d'ammonium, il semble bien que le sac ne contienne plus qu'une seule phase constituée par un précipité.

Autrement dit on retrouve ici à l'intérieur des sacs à dialyse les différentes zones que nous avons schématisées sur la figure 15. La sérumalbumine de bœuf utilisée pour ces expériences est une protéine particulièrement soluble. Les droites qui limitent sa zone de précipitation (première partie de la zone II) ont été déterminées : elles coupent l'axe des abscisses vers 24 p. 100 et 30 p. 100 de sulfate d'ammonium respectivement.

Le domaine de solubilité totale (compris par conséquent entre 0 et 24 p. 100 de sel) est donc relativement grand tandis que la zone de relargage, comprise dans un intervalle de concentrations salines de l'ordre de 6 p. 100, est assez étroite.

Convergence des lignes de conjugaison dans les équilibres avec membrane.

Les résultats groupés sur les figures 21 et 22 permettent de mesurer l'ordonnée à l'origine π des lignes de conjugaison ainsi obtenues en fonction de l'abscisse Σ de leur intersection avec l'axe des abscisses. La courbe de π en fonction de Σ est une droite horizontale (fig. 23) dans tout l'intervalle de concentrations salines du sulfate d'ammonium, de 0 à 43 p. 100.

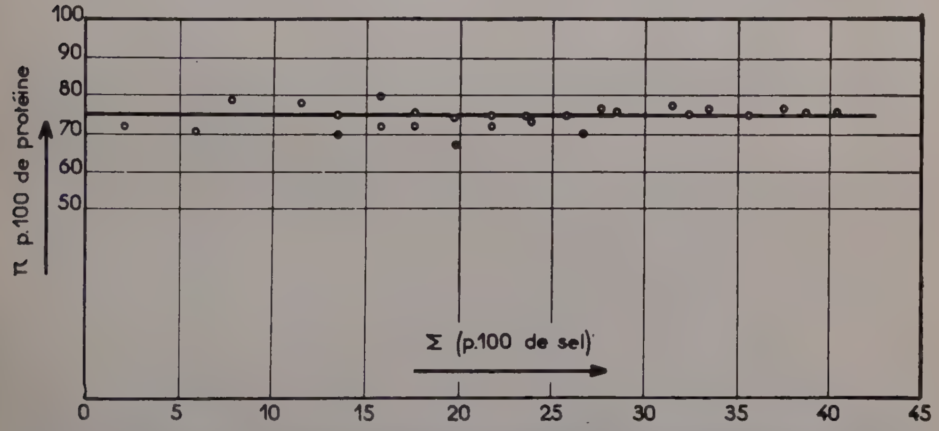


FIG. 23. — Étude de la convergence des lignes de conjugaison dans les diagrammes relatifs aux équilibres avec membrane : valeurs des ordonnées à l'origine des lignes de conjugaison en fonction de leurs abscisses à l'origine (pour les systèmes représentés sur les figures 21 et 22).

On peut donc considérer comme acquise la convergence des lignes de conjugaison et ceci dans un large domaine.

Les avantages de l'emploi d'une membrane apparaissent maintenant plus clairement. On connaît les lignes de conjugaison non seulement dans la zone de relargage, mais aussi dans tout le domaine de solubilité de la protéine. Étant donné la constance de π dans un aussi large domaine,

il devient légitime et raisonnable de présumer l'existence d'un hydrate de protéine. Mais ceci n'est encore qu'une interprétation ; les expériences qui suivent vont nous montrer que c'est une réalité.

Équilibres à concentration saline extérieure constante.

Les mêmes équilibres de part et d'autre d'une membrane ont été réalisés en laissant constante la concentration de la solution saline extérieure, et en faisant au contraire varier la quantité de protéine dans l'unité de volume du sac.

Trois séries de systèmes ont été réalisées, correspondant chacune à une solution saline extérieure déterminée, à savoir : 9,8, 19,9 et 23,85 p. 100 de sulfate d'ammonium. Le pH de ces solutions était de 5,2.

Pour chaque série, les proportions de protéine à l'intérieur des sacs ont varié entre 3 et 16 p. 100.

Les volumes de solutions salines extérieures étaient bien entendu suffisamment grands par rapport à ceux des sacs pour que la variation de concentration saline, à l'extérieur, consécutive aux échanges d'eau

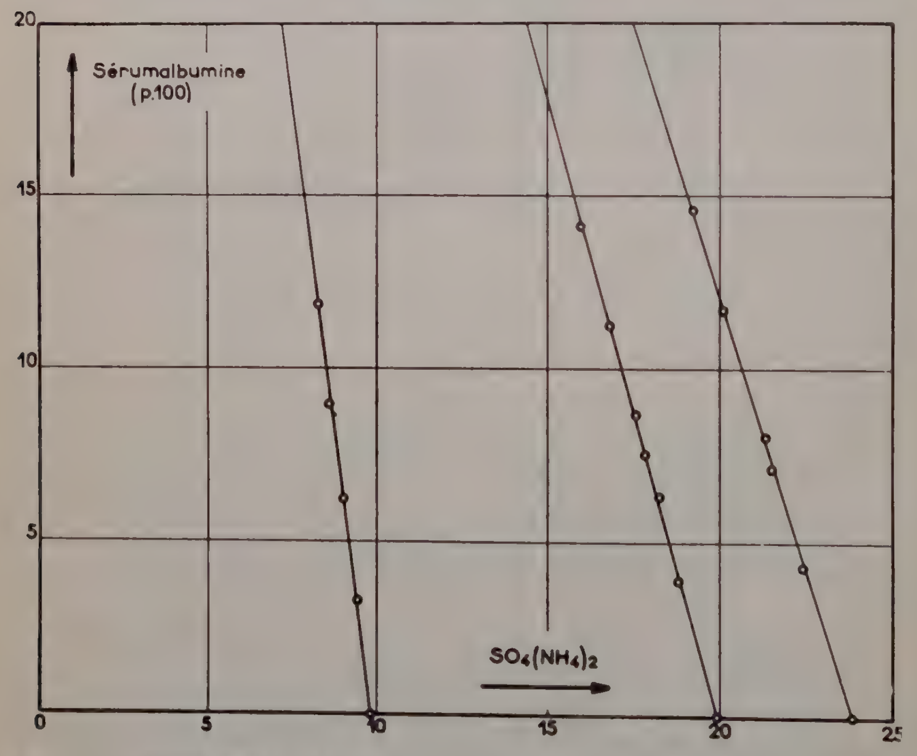


FIG. 24. — Diagramme relatif à des équilibres avec membrane : avec chacune des trois solutions saline extérieures représentées sur l'axe des abscisses, on a mis en équilibre des sacs de même taille contenant des quantités variables de protéine. Température : 23°C ; pH = 5,2.

et de sel à travers la membrane soit négligeable. Comme précédemment, les solutions salines extérieures et les contenus des sacs ont été analysés après que l'équilibre ait été atteint.

Les résultats, représentés sur la figure 24, prouvent que les différents systèmes en équilibre, à travers une membrane, avec une même solution saline ont des points représentatifs alignés entre eux ainsi qu'avec celui de la solution saline extérieure, sur la même ligne de conjugaison.

Les trois droites ainsi obtenues coupent l'axe des ordonnées pour les valeurs suivantes de π :

pour Σ = 9,8 p. 100	π = 75,4 p. 100
= 19,9	= 74,5
= 23,85	= 75,2
soit, en moyenne	π = 75 p. 100 de sérumalbumine.

Ces dernières séries d'expériences fournissent une détermination du point de convergence des lignes de conjugaison plus précise que la droite montrant la constance de π quand Σ varie (fig. 23).

Du point de vue expérimental, en effet, le graphique donnant les valeurs de π en fonction de Σ rend qualitativement mieux compte de la constance de π. Mais, quantitativement, il est en pratique plus facile d'évaluer π par l'intersection, avec l'axe des ordonnées, de quelques lignes de conjugaison, ces dernières étant déterminées par un nombre suffisant de points, plutôt que par l'intersection d'un grand nombre de lignes de conjugaison déterminées chacune seulement par deux points et sujettes, de ce fait, à une incertitude d'autant plus grande que les deux points sont très proches l'un de l'autre.

A propos de composés d'addition de la cellulose, CHAMPETIER et NÉEL (27) font à peu près la même remarque dans des conditions similaires.

Remarque sur les équilibres avec membrane.

Nous devons maintenant préciser dans le détail les conditions dans lesquelles ont été réalisés les équilibres représentés sur les figures 21 et 22.

En ce qui concerne les systèmes de la figure 22, on peut distinguer plusieurs séries suivant les conditions initiales.

Tous les systèmes en équilibre avec des solutions extérieures contenant entre 0 et 10 p. 100 de sel forment une première série caractérisée par le fait que les sacs (d'une capacité de 5 cm³) ont été remplis *partiellement* à raison de 2,5 cm³ de solution protéique (à 5 p. 100 de sérumalbumine), soit à moitié remplis.

Tous les systèmes en équilibre avec des solutions salines de composition comprise entre 10 et 24 p. 100 de sulfate d'ammonium correspon-

dent à des sacs d'une capacité de 5 cm^3, initialement remplis avec 3 cm^3 d'une solution aqueuse à 5 p. 100 de sérumalbumine. Ils sont donc remplis aux 3/5, et constituent une deuxième série.

Enfin les autres systèmes de la figure 22, ainsi que tous ceux de la figure 21, correspondent à des sacs pleins au départ. La solution aqueuse de sérumalbumine était à 10 p. 100 de protéine pour ceux de la figure 21, et à 5 p. 100 pour ceux de la figure 22.

L'expérience montre que les sacs initialement remplis à moitié ont, à l'équilibre (fig. 22) une composition en protéine moitié de celle qu'ont les sacs initialement pleins de la même solution. Autrement dit, *le paramètre important n'est pas la teneur en protéine de la solution aqueuse dont on remplit initialement les sacs, mais le rapport du poids sec de protéine à la capacité du sac.*

En effet, comme la protéine se trouve emprisonnée dans l'enceinte formée par le sac, elle exerce une pression osmotique qui tend à faire rentrer de l'eau et du sel, et qui se trouve équilibrée par la tension mécanique de la membrane.

D'autre part cet ensemble d'expériences montre aussi que *les échanges dont il s'agit ici à travers les membranes sont réversibles* et aboutissent à un état d'équilibre bien défini, puisque peu importe le chemin parcouru pour arriver à l'état d'équilibre : qu'on parte d'un sac de capacité $2v$ rempli avec un volume v de solution aqueuse de protéine de concentration c, ou bien qu'on parte d'un sac de capacité v rempli avec un volume v de solution aqueuse de protéine de concentration $c/2$, on aboutira dans les deux cas au même équilibre.

Mise en évidence d'eau liée aux protéines.

Une conséquence importante résulte de ce qui précède.

Si, au sein d'une solution saline de composition Σ (fig. 25), on détend réversiblement à l'intérieur d'une enceinte semi-perméable une solution aqueuse de sel et de protéine représentée par le point M initialement en équilibre avec cette solution saline Σ, l'expérience montre que le point représentant la composition de la solution saline de protéine se déplace de M vers Σ *suivant la droite* $M\Sigma$. Inversement, si au lieu d'une détente on effectue une compression, le point représentant la composition de la solution de sel et de protéine va se déplacer à partir de M suivant le prolongement du segment ΣM. Puisque le point représentatif se déplace dans tous les cas suivant la ligne $M\Sigma$, il s'ensuit que, d'après la règle des mélanges (voir au chapitre I), *la composition du liquide qui rentre ou qui sort n'est autre que celle représentée par le point* Σ.

Donc, lors d'une compression, la quantité de solution saline extérieure augmente sans changer de concentration. On pourrait s'attendre à ce

qu'une telle compression poussée au maximum aboutisse à exprimer totalement le sel et l'eau du sac, jusqu'à ce qu'il ne reste plus que la protéine à l'intérieur : la composition du sac correspondant alors à 100 p. 100 de protéine. En fait, *l'expérience prouve que cette compression maximum laisserait à l'intérieur du sac un complexe correspondant à 75*

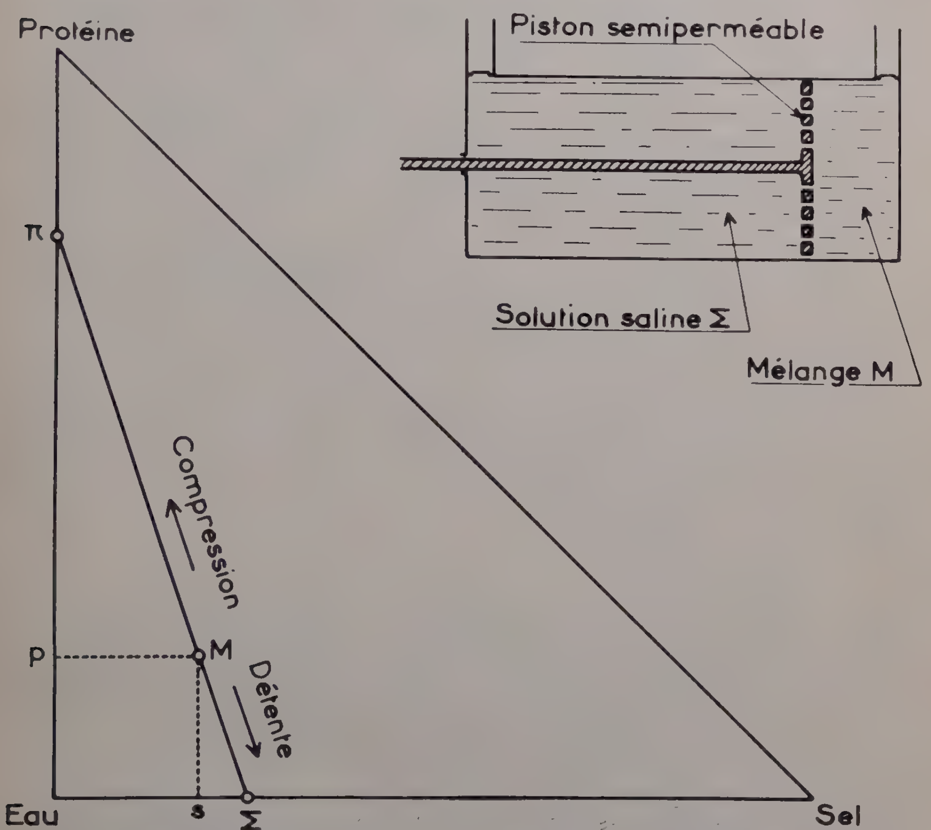


Fig. 25. — Schéma de la compression réversible d'une solution de sel et de protéine dans l'eau : mise en évidence de l'hydrate de protéine.

p. 100 de protéine et représenté par le point π, autre extrémité de la droite ΣM. Autrement dit, les 25 p. 100 d'eau restant s'avèrent incapables de faire fonction de solvant vis-à-vis du sel, ils ne sont pas libres. D'où le terme « d'eau liée » suggéré depuis longtemps à juste titre par plusieurs auteurs.

Quoiqu'il en soit, il est probable que le complexe protéine-eau liée (représenté par le point π sur la figure 25) n'est pas isolable. Cela ne change rien au fait que dans tout le domaine d'existence des solutions de sulfate d'ammonium (entre 0 et 43 p. 100) et pour des proportions de protéine allant de 0 à 30 p. 100, la sérumalbumine de bœuf étudiée se trouve, en solution saline, liée à une quantité d'eau égale au tiers de son poids (25 g d'eau pour 75 g de protéine).

Les expériences précédentes ont encore deux autres conséquences importantes.

Quel que soit le domaine du diagramme dans lequel on se place (solubilité totale, précipitation, insolubilité totale), les équilibres traduits sur la figure 22 correspondent à des lignes de conjugaison qui convergent toutes vers le même point : *donc la quantité d'eau liée est indépendante du fait que la protéine se trouve à l'état dissous ou à l'état précipité* ; dans tous les cas elle existe sous la forme d'hydrate et du même hydrate.

D'autre part on voit que, dans les diagrammes relatifs aux équilibres avec membrane (fig. 21, 22 et 24), *une ligne de conjugaison donnée représente le lieu des points pour lesquels la concentration du sel dans l'eau libre a une valeur constante donnée.*

L'existence d'eau liée aux protéines dissoutes dans des solutions de sulfate d'ammonium étant ainsi bien établie, le problème se posait de savoir comment se comporte l'hydrate de protéine d'une part en l'absence d'ions, d'autre part en présence d'ions autres que ceux du sulfate d'ammonium, sans oublier le cas de l'ion hydrogène. Aussi avons-nous étudié des solutions de sérumalbumine dans l'eau, puis dans des solutions de sulfate d'ammonium à différents pH et enfin dans des solutions de divers sels autres que le sulfate d'ammonium.

Solutions de protéine dans l'eau pure.

De nombreuses méthodes, auxquelles nous nous arrêterons plus loin, ont été utilisées dans le but de démontrer l'existence d'eau liée à différentes protéines. Pratiquement, aucune d'entre elles ne fournit de preuves directes. Néanmoins certains indices permettent de penser que les hydrates existent aussi bien en solution dans l'eau pure qu'en présence de certains sels : ainsi Mc Meekin et Warner ont établi que la densité de cristaux de β-lactoglobuline est la même dans l'eau pure et dans des solutions de sulfate d'ammonium, densité anormalement basse dont les valeurs s'expliqueraient en admettant l'existence d'un hydrate (53).

Aucune étude de cinétique de l'hydratation ou de la dessiccation de systèmes protéine-eau n'ayant été tentée à notre connaissance, nous avons effectué quelques essais.

De la sérumalbumine de cheval, préalablement cristallisée, était placée soit à l'état sec, soit sous forme de solution dans une enceinte étanche à 23° en présence soit d'eau, soit d'un desséchant (de l'anhydride phosphorique le plus souvent). L'opération durait de quelques heures à une ou deux journées.

Le récipient renfermant la protéine était périodiquement sorti durant un court instant (environ une demi-minute) pendant lequel on le pesait.

Poids de la solution
de sérumalbumine
(en mgr.)

900
800
700
600
500
400
300

35 %
46 %
53 %
59 %
66 %
71 %
77 %
80 %
83 %
85 %

Temps (en minutes)

0
100
200
300
400

FIG. 26. — Courbe d'évaporation d'une solution aqueuse de protéine en fonction du temps. Pour chaque point, on a indiqué la composition de la solution en sérumalbumine (de cheval).

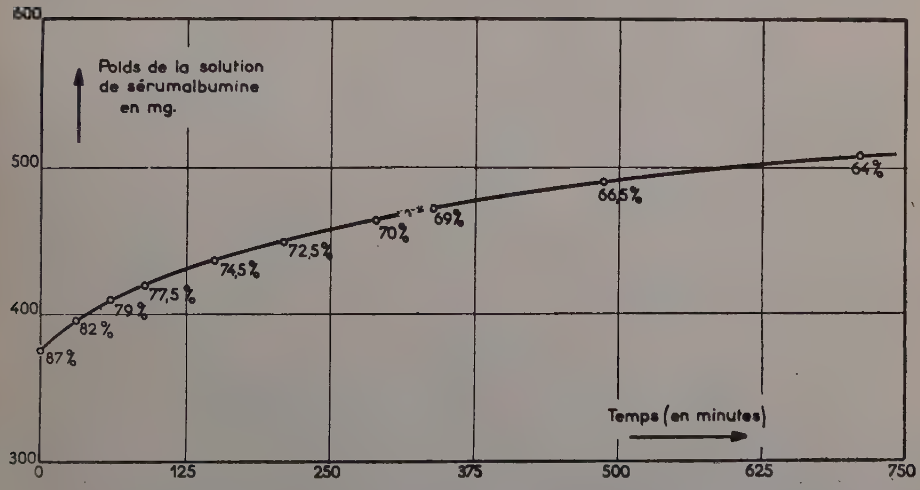


FIG. 27. — Courbe de réhydratation d'une protéine en fonction du temps. Pour chaque point, on a indiqué la composition du mélange en sérumalbumine (de cheval).

Les courbes des figures 26 et 27 donnent l'allure de la dessiccation puis de la réhydratation d'un même échantillon de sérumalbumine de cheval en fonction du temps. On a indiqué pour chaque point le pourcentage de matière sèche (rapport protéine au total protéine-eau). On était en droit de s'attendre à trouver une discontinuité dans les courbes entre 60 et 80 p. 100 de matière sèche. Rien ne permet de détecter le

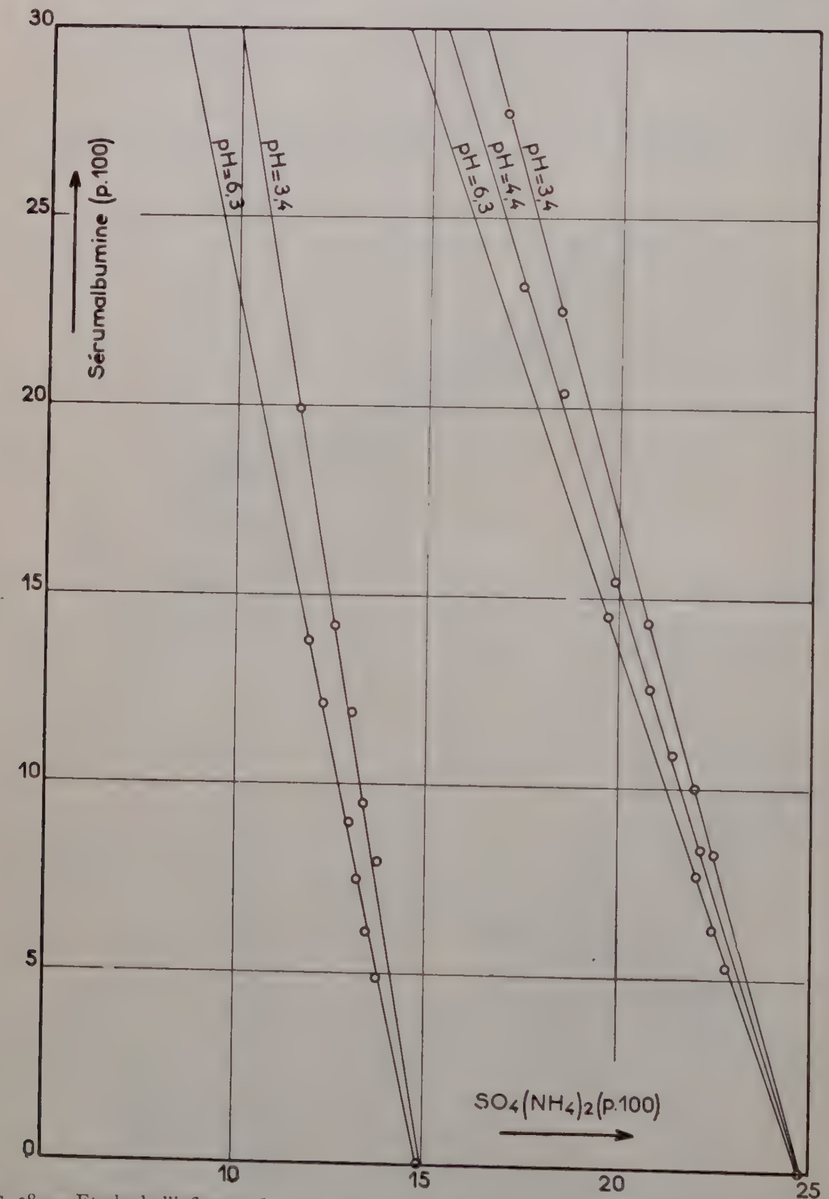


FIG. 28. — Etude de l'influence du pH sur la quantité d'eau liée : diagramme relatif à des équilibres avec membrane réalisés à différents pH pour deux concentrations salines extérieures données.

moindre incident, du moins dans les conditions rudimentaires où nous avons opéré. Il aurait fallu, pour bien faire, utiliser un dispositif à marche continue (une balance enregistreuse, par exemple).

En tout cas, nos essais n'apportent pas de réponse positive.

Influence du pH sur la quantité d'eau liée.

En utilisant des équilibres avec membrane, on a opéré avec des solutions de sulfate d'ammonium de pH compris entre 3,4 et 6,4. En pratique, il est difficile de descendre au-dessous de pH = 3,4, sans ajouter des quantités d'acide sulfurique qui ne soient pas négligeables ; et il est bien entendu impossible avec des sels d'ammonium de passer en milieu alcalin.

L'éventail des lignes de conjugaison sur la figure 28 montre que la quantité d'eau liée augmente avec le pH. Les valeurs de π ainsi mesurées, jointes à celles fournies par les expériences rassemblées sur la figure 24, permettent de dresser le tableau des valeurs de π en fonction du pH.

Solutions de $SO_4(NH_4)_2$	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100	25 p. 100
pH = 3,4		86		87
pH = 4,4				79
pH = 5,2	75,4		74,5	75,2
pH = 6,3		71,5		72,5

Influence de divers ions salins.

Toujours avec des systèmes sérumalbumine (de bœuf)-sel-eau, des équilibres de membrane ont été réalisés en utilisant les sels suivants :

$PO_4H_2(NH_4)$ SO_4Na_2 CH_3COOK ClNa.

Avec le phosphate d'ammonium, souvent utilisé pour la précipitation des protéines, quatre séries d'équilibres ont été préparées, correspondant à des proportions de sel d'environ 10, 15, 20 et 25 p. 100.

Un peu de phosphate biammonique a dû être ajouté afin que le pH des solutions salines extérieures soit voisin de 5.

La figure 29 représente les résultats et donne, pour valeur des ordonnées à l'origine des différentes lignes de conjugaison :

pour Σ = 14,9 p. 100 (pH = 5,15) π = 72,5
= 20,0 p. 100 (pH = 5) = 72,5
= 24,6 p. 100 (pH = 4,85) = 74
= 29,6 p. 100 (pH = 4,8) = 73,5

soit π moy. = 73,3 p. 100 de sérumalbumine.

Ces valeurs trouvées pour l'eau liée à la sérumalbumine de bœuf dissoute dans des solutions de phosphate d'ammonium sont très voisines de celles trouvées en présence de sulfate d'ammonium.

C'est donc là une confirmation supplémentaire de l'existence d'un hydrate d'albumine.

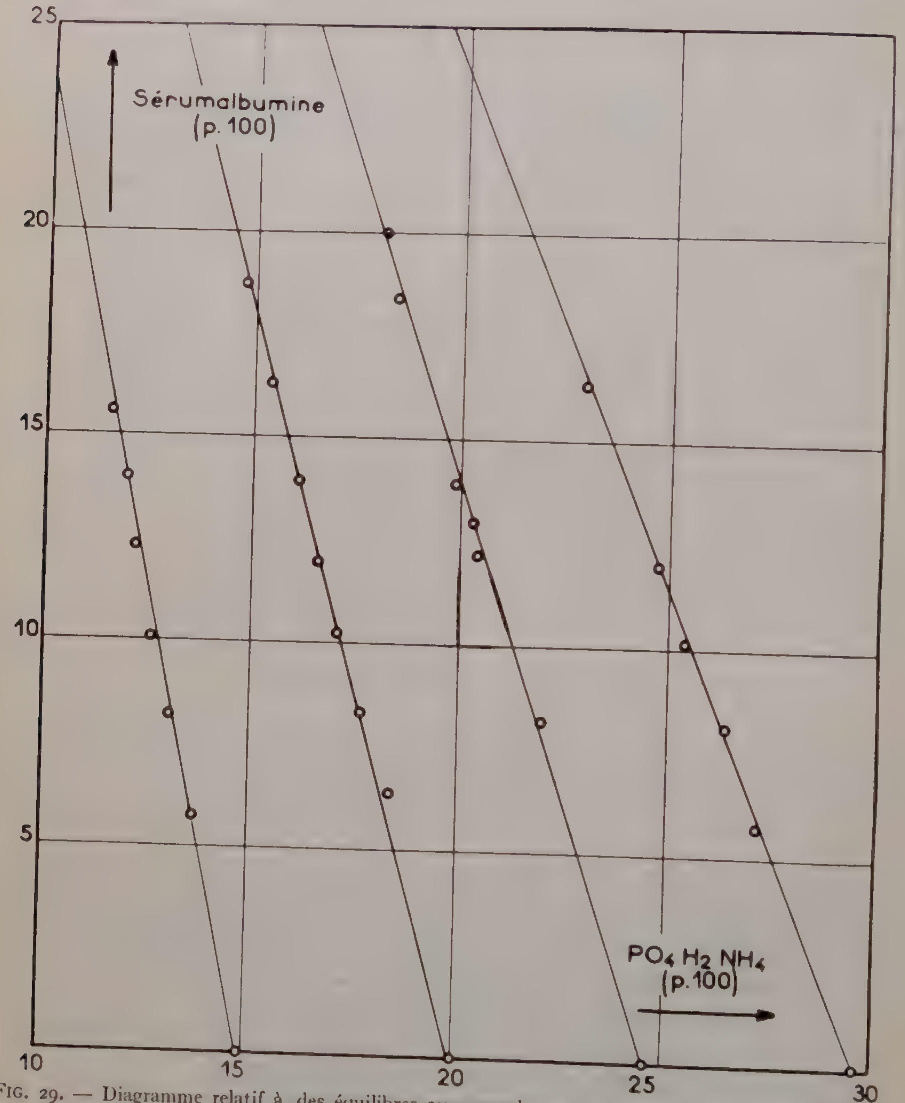


FIG. 29. — Diagramme relatif à des équilibres avec membrane : systèmes sérumalbumine (bœuf)-$PO_4H_2NH_4$-eau ; pH = 5 ± 0,2.

On remarque, sur le tableau ci-dessus, que les valeurs de π semblent plus élevées pour les pH les plus faibles, autant qu'on puisse juger avec quatre échantillons ; ceci corrobore les résultats donnés plus haut sur l'influence du pH.

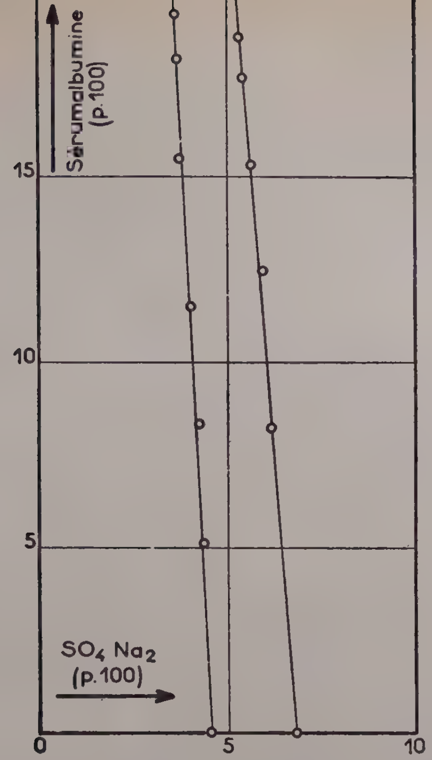


FIG. 30. — Diagramme relatif à des équilibres avec membrane : systèmes sérumalbumine (bœuf) SO_4Na_2-eau ; pH = 5,8.

FIG. 31. — Diagramme relatif à des équilibres avec membrane : systèmes sérumalbumine (bœuf-) CH_3COOK-eau ; pH = 6.

Les figures 30, 31 et 32 représentent les équilibres avec membrane réalisés respectivement avec du sulfate de sodium, de l'acétate de potassium et du chlorure de sodium.

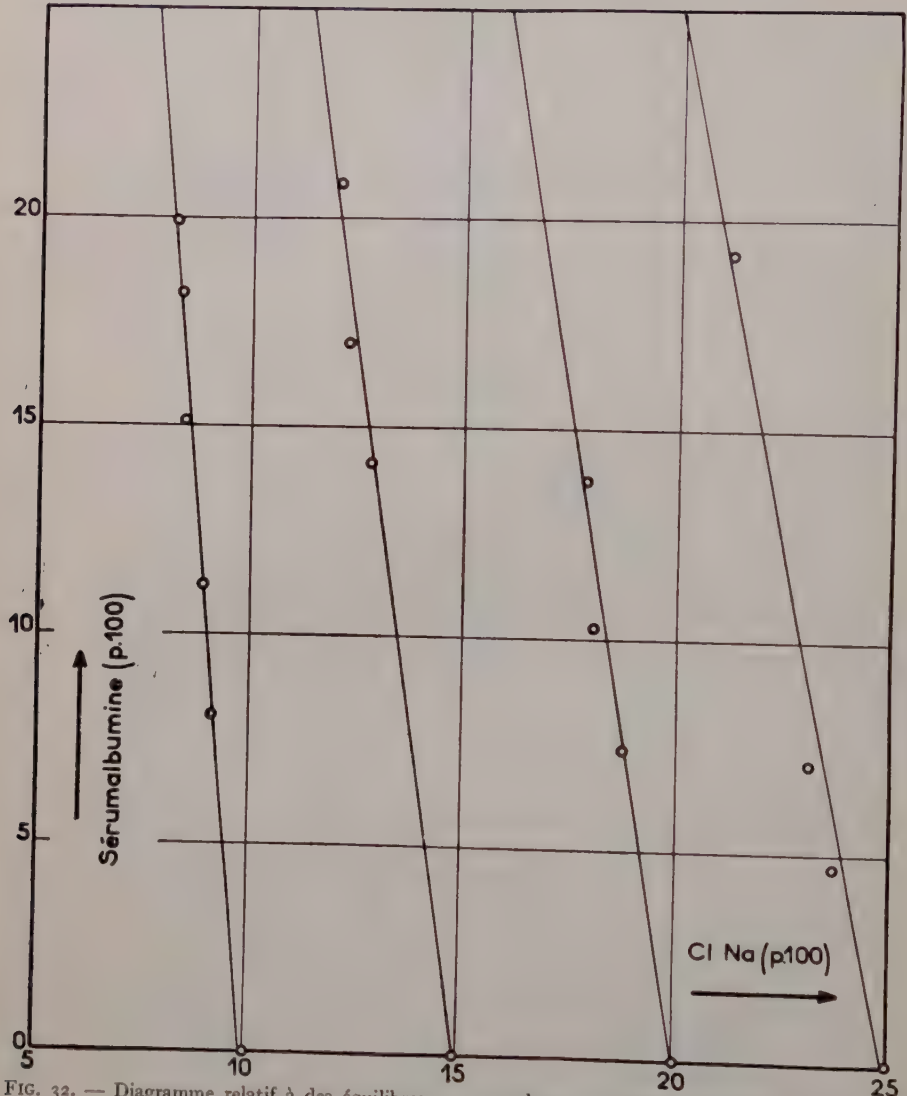


FIG. 32. — Diagramme relatif à des équilibres avec membrane : systèmes sérumalbumine (bœuf)-ClNa-eau ; pH = 5.

Pour SO_4Na_2 et CH_3COOK, les lignes de conjugaison convergent sensiblement vers 100 p. 100. Pour ClNa, les lignes de conjugaison coupent l'axe des ordonnées en dehors du diagramme, c'est-à-dire pour des valeurs de π n'ayant pas de signification physique. Il est toutefois intéressant de noter que ces valeurs de π augmentent en même temps que Σ. Les lignes de conjugaison sont en effet presque parallèles.

Comment interpréter ces derniers résultats ? Ne sont-ils pas en contradiction avec les précédents et ne viennent-ils pas mettre en doute l'existence d'eau liée aux protéines ? Nous nous proposons de discuter maintenant ces problèmes.

2. — Discussion.

L'intérêt et les possibilités d'application des équilibres avec membrane en tant que méthode de détection et d'analyse de composés feront l'objet du début de cette discussion. Nous envisagerons ensuite comment les problèmes posés par la mesure de l'eau liée ont été jusqu'ici abordés par différents auteurs. Nous terminerons en discutant les résultats que nous avons obtenus sur l'hydratation des protéines.

La méthode des équilibres avec membrane utilisée pour mettre en évidence l'eau liée à la sérumalbumine et en évaluer la quantité est absolument générale. Elle est valable pour n'importe quelle solution de protéine en présence de sel, que cette protéine soit cristallisée ou non. Elle peut en outre s'appliquer à toutes les macromolécules susceptibles de s'associer ou de se combiner avec les constituants d'un mélange binaire (solution saline, solution alcoolique, etc.).

Par son principe, elle s'apparente à la « méthode des restes » et présente également des analogies avec l'ultrafiltration.

La méthode des restes.

Elle est parfois employée pour connaître la composition de produits d'addition ou de substitution. Elle a surtout été appliquée en chimie minérale, et seulement avec des systèmes relatifs à des constituants bien déterminés. Comme elle est malgré tout relativement peu connue, nous croyons préférable de nous y arrêter.

Elle a été introduite par Schreinemakers à la fin du siècle dernier (28). Partant de l'étude des systèmes PbI_2, IK, H_2O (29), cet auteur fut conduit à faire en quelque sorte la théorie des diagrammes ternaires, appliquée à l'exemple général des systèmes formés par deux sels A et B et de l'eau.

« Cette méthode pour connaître la composition d'un sel double ou sa teneur en eau, écrit Schreinemakers (*loc. cit.* p. 81) présente en particulier un grand intérêt lorsqu'on ne peut pas séparer de sa solution le sel double sans le décomposer.

On prépare une solution en équilibre avec le sel double.

On analyse, d'une part, une partie de la solution (dont la composition est par exemple représentée par le point q), d'autre part, l'ensemble

formé par le reste de la solution mélangée avec le sel double (ensemble représenté par le point *r*) (fig. I).

On trace la ligne *qr* dont la détermination est d'autant plus précise que les points *q* et *r* sont plus éloignés l'un de l'autre, ce qui est réalisé quand on prend beaucoup de sel double avec très peu de solution.

De la même façon, on trace une deuxième ligne *sv* (*s* représentant la composition de la solution et *v* celle du mélange solution-sel double restant), la solution représentée par *s* n'étant pas obligatoirement sur l'isotherme de *r*.

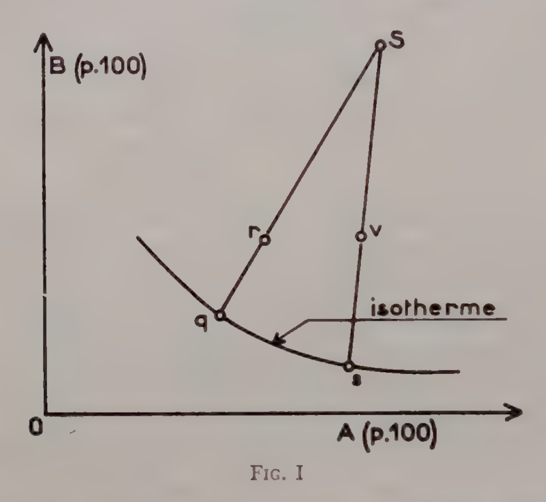


FIG. I

Les deux lignes *qr* et *sv* se coupent en un point S qui donne la composition du sel double. »

SCHREINEMAKERS montre par ailleurs que si, pour un système quelconque tel que celui représenté par les points *q* et *r*, on fait varier un paramètre autre que la composition du système, par exemple la température, le point donnant la composition de la solution prend une série de positions alignées sur la droite *q*S, tout au moins dans le domaine de température à l'intérieur duquel le sel double représenté par S existe.

L'application de cette méthode à des substances moins bien définies que celles de la chimie minérale n'offre pas d'obstacles, mais s'avère beaucoup moins sûre quant aux conclusions qu'on est en droit d'en tirer. En effet, en chimie minérale, le fait que la composition trouvée pour le sel double étudié (par exemple) corresponde à des proportions stœchiométriques suffit pratiquement à confirmer pleinement l'existence de ce sel double

Avec des corps comme les protéines, il n'est plus question de proportions stœchiométriques. Et dans le cas d'hydrates de protéine, c'est-à-dire de composés d'addition, le problème est encore plus difficile qu'avec des produits de substitution.

La première tentative d'application à des grosses molécules organiques ou biologiques fut effectuée en 1907 par VIEWEG (30) avec la cellulose, mais sans succès. Il a fallu attendre jusqu'à ces toutes dernières années pour que des recherches soient reprises dans ce domaine et menées à bien par CHAMPETIER et NÉEL (27) avec la mise en évidence de deux hydrates de la cellulose.

Ces auteurs montrent comment la méthode des restes, convenablement appliquée, peut être une *méthode de détection* d'un composé d'addition ou de substitution, en même temps qu'une *méthode d'analyse.*

Le polymère P solide, immergé dans un mélange binaire AB (d'une solution du corps B dans le corps A, par exemple) est pratiquement insoluble dans ce mélange. Chacune des droites du faisceau convergent qui permet de déterminer la formule du composé est obtenue en joignant une série de points expérimentaux correspondant à des degrés progressifs d'essorage ou de centrifugation du polymère. La condition imposée au polymère d'être insoluble dans le mélange AB limite évidemment les possibilités d'utilisation de la méthode.

L'emploi d'une membrane permet de se libérer de cette condition, et il facilite les opérations.

On peut en effet opérer dans un domaine plus vaste, ainsi que nous l'avons vu avec les solutions salines de protéine : la présence de la membrane augmentant d'une unité le nombre des phases du système, il devient possible d'utiliser la zone qui ne comporte normalement qu'une phase, c'est-à-dire celle de la solubilité totale. Le secteur dans lequel on peut tracer des lignes de conjugaison se trouve de la sorte élargi.

D'autre part ce procédé permet de se libérer de toute considération relative à un fractionnement éventuel de la substance étudiée. Avec les protéines, nous verrons plus loin (chap. IV) que chaque ligne de conjugaison située à l'intérieur du domaine de relargage (fig. 15) est relative à un groupe de fractions protéiques particulier : si, à chacun de ces groupes, correspondait une hydratation différente, le faisceau des lignes de conjugaison obtenu dans les diagrammes de phases ne convergerait pas vers un point et un seul ; mais le faisceau des lignes de conjugaison relatives aux équilibres avec membrane serait tout de même convergent en un point unique correspondant à l'hydratation moyenne de l'ensemble de toutes les fractions, puisque les différents systèmes intérieurs aux sacs contiennent toujours le même échantillon initial de protéine, et par conséquent le même mélange de fractions protéiques. Autrement dit, même en présence d'un mélange — d'un mélange de macromolécules de structure et de propriétés voisines — la méthode des équilibres avec membrane reste un procédé parfaitement valable pour la détection de combinaisons ou de substitutions.

Enfin, il est essentiel de remarquer que le paramètre variant lorsqu'on

se déplace le long d'une ligne de conjugaison prend ici une signification physique : c'est tout simplement la concentration de la protéine dans le volume égal à la capacité du sac. Ce paramètre est exactement l'homologue de la température dans les expériences de SCHREINEMAKERS.

L'ultrafiltration.

Cette dernière remarque nous conduit à signaler l'analogie de la méthode avec l'ultrafiltration. On doit à MC BAIN et JENKINS (31) l'idée d'avoir employé pour la première fois, en 1922, l'ultrafiltration pour la mesure de l'hydratation des savons. En ultrafiltrant des solutions de laurate de potassium et d'oléate de sodium et en comparant la composition de l'ultrafiltrat et celle de la partie restant dans l'ultrafiltre, MC BAIN et JENKINS trouvent une hydratation d'environ 10 molécules d'eau par équivalent de savon.

Les deux parties du système de part et d'autre de l'ultrafiltre correspondent à celles situées de part et d'autre de la membrane — ou encore du piston semiperméable de la figure 25. Mais une différence fondamentale distingue les deux procédés : dans l'ultrafiltration, il existe une dépression notoire entre les deux parties du système. On n'opère par conséquent pas dans des conditions d'équilibre. MC BAIN avait bien entendu pensé à cet écueil ; en prônant cette méthode pour déterminer la « solvatation des colloïdes », il insiste sur les précautions dont il faut s'entourer et précise que la dépression doit être aussi faible que possible. Dans les équilibres avec membrane, on opère au contraire dans des conditions parfaitement réversibles, la différence de pression entre les deux parties du système étant négligeable.

Peu de temps après ces travaux de MC BAIN et JENKINS, DUCLAUX et TITEICA (32) comprirent tout l'intérêt de l'ultrafiltration appliquée à « l'étude du liquide intermicellaire, à condition qu'on obtienne le liquide intermicellaire sans altération ». Ils l'utilisent pour l'étude d'hydrosols ferriques.

Par la suite, des essais d'ultrafiltration furent effectués avec les protéines, en particulier avec la caséine (33 et 34), l'amidon, le sérum (35) par GREENBERG et ses collaborateurs. Malheureusement ces auteurs, dont l'intention est d'éclaircir le problème très discuté de l'existence d'eau liée aux « colloïdes biologiques », opèrent dans de mauvaises conditions ; après avoir eux-mêmes spécifié que les constituants du mélange binaire choisi ne doivent pas « réagir ni être adsorbés » par le colloïde étudié, ils décrivent des expériences d'ultrafiltration dans lesquelles ces mélanges binaires sont des solutions de chlorure ou d'urée . De plus, ils opèrent avec des teneurs en protéines extrêmement faibles. De sorte qu'on ne peut se baser sur leurs résultats pour conclure à l'inexistence d'eau liée.

Autres méthodes s'inspirant des deux précédentes.

Mise à part cette tentative utilisant l'ultrafiltration, aucun essai n'a été tenté à notre connaissance pour démontrer directement l'existence d'eau liée aux protéines.

Il faut cependant signaler un travail important de SÖRENSEN et HÖYRUP (17) datant de 1917 sur l'albumine cristallisée dont ces auteurs sont amenés à supposer l'existence sous forme d'hydrate. Peut-être n'a-t-on pas assez apprécié la valeur de leur tentative. La « méthode de proportionnalité » sur laquelle ils se basent rappelle la méthode des restes qu'ils semblent d'ailleurs ignorer. Cependant, ainsi qu'ils le font remarquer, leur raisonnement reste basé sur une hypothèse ; et si leurs expériences permettent de présumer l'existence de cet hydrate d'ovalbumine, elles n'apportent pas de preuves suffisantes. Le fait est que peu d'auteurs ont tenu compte de leurs conclusions depuis. Ou bien alors ils se contentent de reprendre les mêmes hypothèses, comme le fait DRABKIN à propos de l'hémoglobine (36), sans apporter la moindre preuve expérimentale.

Tout récemment, MC MEEKIN, GROVES et HIPP (6) ont étudié la composition de cristaux de protéine de grande taille (β-lactoglobuline, hémoglobine et chymotrypsine). Leur travail présente l'avantage d'être fondé sur un assez grand nombre d'expériences, mais eux aussi adoptent sans restriction les hypothèses de SÖRENSEN. D'autre part la précision de leurs mesures n'est pas suffisante pour conduire à des conclusions sûres, ce qui amène LOW et RICHARDS (37) à contester l'exactitude de leurs résultats.

En résumé, les expériences de SÖRENSEN et HÖYRUP — ainsi que les travaux effectués dans le sillage de ces auteurs — sont les seules auxquelles les mesures que nous avons faites pourraient à la rigueur s'apparenter. Aucun essai d'emploi des membranes n'avait été fait, bien que DUCLAUX et TITEICA (32) en aient signalé l'intérêt.

L'utilisation des membranes par MC MEEKIN, COHN et leurs collaborateurs (38, 39 et 40) ne doit pas être confondue avec celle que nous en avons faite : il s'agit dans ce cas simplement de ralentir la diffusion des ions salins dans une solution de protéine pour obtenir, par exemple, des cristaux de grande taille au moyen d'une croissance la plus lente possible.

Équilibre de Donnan.

On trouve dans la littérature le terme « équilibre de membrane » dû à DONNAN lui-même (41 et 42) pour désigner l'effet de distribution inégale d'ions diffusibles de part et d'autre d'une membrane, quand cette dernière empêche la diffusion d'un polyélectrolyte dans toute la masse du

système. Il s'agit là d'un phénomène mettant en jeu des ordres de grandeurs tout à fait différents de ceux qui nous intéressent dans les équilibres avec membrane des systèmes protéine-sel-eau que nous avons étudiés. Rappelons que l'effet DONNAN suppose (43) que :

1° L'ionisation est totale, de sorte qu'on peut assimiler les activités aux concentrations, même pour le polyélectrolyte.

2° La diffusion des ions de même valence dans chaque sens est identique.

Les équations établies par DONNAN ne sont valables qu'avec des systèmes extrêmement dilués et ne concernent donc qu'un domaine très restreint de concentrations. Pour notre part, nous avons opéré dans des zones très éloignées de la dilution, dans des conditions où la dissociation devient négligeable.

C'est là une des raisons pour lesquelles nous avons préféré rejeter le terme « équilibre de membrane » pour éviter toute confusion des phénomènes étudiés avec l'effet DONNAN.

Dans le même domaine des grandes dilutions se placent aussi les mesures effectuées par SCATCHARD et ses collaborateurs (44 et 45) avec des solutions aqueuses très diluées de sérumalbumine et de chlorure de sodium.

Mesures antérieures sur l'hydratation des protéines.

Les travaux publiés sur la mesure de l'eau liée à différentes substances biologiques sont extrêmement abondants. On trouve périodiquement des mises au point à ce sujet (46 et 47), dont certaines se limitent aux protéines (48, 49 et 50). Pour des raisons très variables, un nombre considérable de méthodes se sont révélées jusqu'ici insuffisantes ; c'est le cas des mesures cryoscopiques, des mesures de tension de vapeur, des mesures de viscosité, entre bien d'autres. Souvent les conclusions sont contradictoires.

Nous nous arrêterons ici à quelques-unes des études qui paraissent avoir apporté des résultats positifs.

En 1936, ADAIR (G. S.) et ADAIR (M. E.) effectuent des mesures de densité de plusieurs protéines cristallisées (51) : édestine, ovalbumine, sérumalbumine, hémoglobine. Pour expliquer la différence anormalement faible de densité des cristaux par rapport au milieu de suspension, ils sont conduits à émettre l'hypothèse qu'en équilibre avec une solution saline, les cristaux constituent une véritable phase liquide. L'idée est reprise plus tard par DUCLAUX (52).

Par la suite, MC MEEKIN et WARNER (53) étudient la densité de cristaux de β-lactoglobuline, protéine dont le choix est particulièrement judicieux, étant donné qu'elle cristallise aussi bien en présence qu'en

l'absence de sel. Ils concluent que la faible densité des cristaux de cette protéine pourrait bien s'expliquer par leur hydratation et que cette dernière serait alors indépendante de la présence de sel. Ainsi que nous l'avons déjà vu, Mc Meekin, Groves et Hipp (6) viennent tout récemment de compléter et de généraliser ces mesures, ainsi que Low et Richards (37 et 54) avec d'ailleurs de légers désaccords entre les valeurs numériques auxquelles aboutissent les deux équipes.

En 1947, Perutz (8 et 55) conclut de ses études sur la diffraction des rayons X par les cristaux de méthémoglobine que ceux-ci contiennent une proportion constante d'eau liée, quelle que soit la concentration saline de la solution en équilibre avec le cristal. Bien mieux, il arrive à localiser les molécules d'eau liée et trouve qu'elles forment une couche monomoléculaire tapissant une partie de la surface de la molécule d'hémoglobine.

Le travail des cristallographes est le premier à donner une preuve expérimentale de l'existence de l'eau liée à certaines protéines, alors que toutes les autres recherches ne fournissaient jusque-là que des présomptions. Tout récemment, Perutz a signalé que les résultats de ses mesures sont remis en question par suite d'erreurs s'étant introduites dans les calculs laborieux qu'exige la diffraction des rayons X. Il est probable cependant que ses conclusions resteront valables, tout au moins du point de vue qualitatif.

Les études à l'infrarouge, qui se sont presque exclusivement limitées jusqu'ici à la gélatine (56) permettront sans doute bientôt de préciser la nature des liaisons entre les molécules d'eau et celles de protéine.

Deux méthodes ont récemment été appliquées pour la première fois, et avec succès, à la mesure de l'hydratation des protéines : en 1952 des mesures de dispersion électrique ont permis de préciser la définition de l'eau liée (57), et de distinguer plusieurs types de liaison entre la molécule de protéine et les molécules d'eau. Les auteurs de ces mesures trouvent entre 0,3 et 0,4 g d'eau liée par gramme de sérumalbumine de bœuf, valeur avec lesquelles nos résultats sont en bon accord. D'autre part, en 1954, Wang (58) a commencé l'étude de la diffusion de l'eau dans les solutions aqueuses de protéine. Il met en présence deux solutions de protéines identiques, l'une étant une solution aqueuse ordinaire et l'autre une solution dans l'eau lourde.

En résumé, plusieurs méthodes permettent aujourd'hui la mise en évidence et l'évaluation de l'eau liée aux protéines, parmi lesquelles on peut surtout retenir : la diffraction des rayons X — à condition que la protéine soit cristallisable et les diagrammes interprétables — la méthode des restes modifiée, et convenablement appliquée ; l'autodiffusion de l'eau dans les solutions de protéines, et les spectres d'absorption en fréquence appropriée.

Localisation de l'eau liée aux protéines.

Dans une vue d'ensemble, Bernal (59) a émis l'idée que les hydrates de protéine, quand ils existent, peuvent revêtir différentes formes. La plus fréquente est probablement celle des phyllohydrates dans lesquels les molécules d'eau sont rangées côte à côte en un feuillet lié à la surface de la molécule protéique (cas de l'hémoglobine).

Partant de cette conception, si on attribue à la molécule de sérumalbumine une forme sphérique, un poids moléculaire de 65.000 et une densité de 1,15, on peut évaluer approximativement l'épaisseur d'une couche d'eau qui entourerait cette molécule à raison de 0,33 g par gramme de protéine.

Le calcul donne une épaisseur égale à 2,3 Å. Comme la molécule de sérumalbumine a une forme assimilable en première approximation à un ellipsoïde, on doit trouver une épaisseur d'eau inférieure à celle calculée pour la forme sphérique. La molécule d'eau ayant un diamètre théorique de 2,7 Å, il en résulte qu'une couche monomoléculaire d'eau liée ne peut de toute façon pas envelopper toute la molécule de protéine, mais en recouvre seulement une partie (correspondant aux trois quarts ou à la moitié de la surface totale, au point de vue ordre de grandeur). On aboutit donc à une conclusion (fondée sur des hypothèses) semblable à celle à laquelle Perutz a été conduit expérimentalement pour l'hémoglobine.

Nature des liaisons entre eau et protéine et stabilité des hydrates.

Quelles peuvent être les liaisons entre ces molécules d'eau et celles de protéine ?

Les études d'absorption dans l'infrarouge permettent de présumer qu'il s'agit surtout de liaisons par pont hydrogène (56). Et les travaux des cristallographes semblent aussi le confirmer (59).

Autrement dit, les forces intervenant sont beaucoup plus faibles (environ 10 fois) que celles mises en jeu dans les liaisons d'électrovalence ou de covalence. Les hydrates de protéine sont donc des combinaisons fragiles, en tout cas beaucoup moins stables que celles de la chimie classique. C'est ce qui fait la difficulté de leur étude et sans doute ne faut-il pas aller chercher plus loin la cause de tant de discordances dans les travaux dont ils ont fait l'objet.

Cette fragilité explique peut-être pourquoi les courbes de l'hydratation des protéines en fonction de leur tension de vapeur, tracées par nombre d'auteurs tels que Grollmann (60), Bull (61), Mc Laren et Ottesen (62), Dunford et Morrison (63), etc., ne présentent pas de discontinuité permettant de soupçonner l'existence d'eau liée, pas plus que les mesures que nous avons tentées sur la cinétique de la dessiccation.

On peut dès lors comprendre les contradictions apparentes auxquelles nous ont conduit les équilibres avec membrane de systèmes sérumalbumine-sel-eau lorsqu'on a changé la nature du sel.

Les sels d'ammonium tels que le sulfate et le phosphate respectent l'hydrate. Ce fait, joint à leur grande solubilité, n'est peut-être pas sans rapport avec les raisons empiriques qui ont conduit à l'emploi si fréquent de ces deux sels pour l'extraction des protéines.

Le sodium et le potassium, contrairement à l'ammonium, dissocient l'eau de la sérumalbumine, mais ne se fixent pratiquement pas sur la protéine. Ceci n'est pas pour nous étonner, étant donné l'affinité considérable de ces ions pour l'eau.

Enfin le cas du chlorure de sodium est le plus compliqué : les deux ions ont une très grande affinité pour l'eau. Mais en outre l'ion chlore se fixe sur la sérumalbumine. Si l'on admet qu'il se fixe en entraînant avec lui un cortège de molécules d'eau, on conçoit que les lignes de conjugaison ne convergent vers aucun point intérieur au diagramme, mais soient presque parallèles entre elles.

On voit tout l'intérêt que présenterait l'étude ici ébauchée de l'action des ions minéraux sur les hydrates de protéine : c'est une source de renseignements sur la stabilité des hydrates qui vient précieusement compléter les données structurales et énergétiques de la cristallographie, de l'absorption dans l'infra-rouge et de l'absorption diélectrique. En même temps, c'est tout un chapitre qui est ouvert sur le rôle physiologique de ces différents ions dans le métabolisme de l'eau.

3. — Conclusions.

L'étude des équilibres avec membrane des systèmes protéine-sel-eau nous a conduit à mettre au point une méthode apparentée, par son but et par son principe, à la méthode des restes de Schreinemakers. Cette méthode est valable pour toutes les macromolécules et tous les colloïdes mis en présence de systèmes binaires. Elle permet la détection et l'analyse de composés formés entre les grosses molécules et les constituants du mélange binaire, ainsi que la détermination du domaine d'existence des composés. La seule condition exigée des grosses molécules ou des particules est de ne pas diffuser à travers une membrane perméable aux constituants du mélange binaire.

Par l'application de cette méthode aux mélanges protéine-sel-eau, on a démontré l'existence d'eau liée aux protéines, en tant qu'eau non solvante vis-à-vis des ions. On a trouvé pour la sérumalbumine de bœuf 0,33 g d'eau liée par gramme de protéine (à pH = 5,2).

La signification physique des lignes de conjugaison, dans les dia-

grammes relatifs aux équilibres avec membrane, a été explicitée : ces lignes sont les lieux des points représentant les mélanges dans lesquels la concentration du sel dans l'eau libre garde une valeur constante. Le paramètre variable le long d'une même ligne de conjugaison est alors la concentration du mélange en hydrate de protéine.

Que la protéine soit cristallisée ou amorphe, qu'elle soit précipitée ou dissoute, on trouve toujours la même quantité d'eau liée. L'existence et la composition de l'hydrate de protéine ne dépendent donc pas de l'état d'ordre ou d'agrégation dans lequel se trouve la protéine.

En revanche, ils dépendent de facteurs tels que le pH et la nature des ions présents, dont on a étudié l'influence.

Chapitre IV

SOLUBILITÉ ET FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES

Nous abordons maintenant le problème délicat du fractionnement des protéines par les sels. Pour éviter toute équivoque, nous croyons utile de préciser le langage que nous emploierons et les conceptions dont nous partirons.

Faute de définition véritable et de critère rigoureux de la pureté des protéines, et faute aussi de méthode satisfaisante de fractionnement, nous posons que les protéines actuellement extractibles sont constituées par des mélanges de corps purs.

Pour désigner de tels mélanges, nous emploierons le mot *fraction* pris au sens qualitatif, sans préjuger du degré de pureté ou de fractionnement. Partant de cette définition, la sérumalbumine est une fraction protéique, de même que les globulines ; mais les euglobulines, les pseudoglobulines, ou les α-globulines sont aussi des fractions. Le concept de fraction protéique ainsi défini correspond par conséquent à une réalité bien tangible.

Il n'en est pas de même de la notion de *fraction élémentaire* qui est purement théorique. Nous désignerons par fractions protéiques élémentaires les corps purs dont l'ensemble constitue une fraction.

La notion de corps pur prend un intérêt pratique à partir du moment où l'on sait mesurer le degré de pureté, ce qui suppose l'établissement d'une méthode définie de fractionnement. Cette dernière préoccupation fait l'objet principal du présent chapitre.

1. — Résultats expérimentaux.

Seuil de précipitation et solubilité dans les solutions salines.

Il a été fait allusion plus haut (cf. Ch. II, p. 57) au fait que les courbes que l'on trouve dans la littérature, relatives au relargage des protéines et donnant la teneur en protéine (ou en azote) du surnageant en fonction de la proportion globale de sel ne sont pas des courbes de solubilité.

Les résultats expérimentaux exposés dans le chapitre II permettent déjà par eux seuls de tracer la véritable courbe de solubilité d'une fraction protéique : c'est tout simplement la courbe que, nous réservant de traiter le problème seulement dans le présent chapitre, nous avons appelée jusqu'ici courbe des seuils de précipitation (fig. 10 et 13).

En effet, si on revient aux définitions, *la solubilité d'un corps pur ou d'un mélange de corps purs est la proportion maximum du corps pur ou du mélange pouvant rester dissoute pour des valeurs déterminées des paramètres fixant l'état du système.* Quand on fait varier un seul de ces paramètres (la proportion de sel dans le cas présent) la courbe de solubilité donne alors la proportion maximum restée dissoute pour chaque valeur du paramètre.

Il suffit de se reporter aux conditions dans lesquelles a été établie la figure 13 relative à des pseudoglobulines pour constater qu'il s'agit bien d'une véritable courbe de solubilité : en chaque point, les *mêmes* pseudoglobulines se trouvent exactement à la saturation pour une concentration saline déterminée puisque la précipitation commence dès qu'on franchit la courbe de la gauche vers la droite.

Une telle observation a pu être généralisée grâce aux expériences que nous allons décrire dans le paragraphe suivant et dont les conséquences sont multiples et importantes.

Expérience de reprécipitation de la fraction protéique provenant d'un surnageant.

Une solution aqueuse de pseudoglobuline à 19,2 p. 100 de protéine, représentée par le point A sur la figure 33, a été additionnée d'une quantité de solution saturée de sulfate d'ammonium telle que le système résultant est représenté par le point M_0. Un tel système se sépare en deux phases, puisque le long du parcours AM_0 correspondant à l'addition progressive de la solution saline, la précipitation débute dès que l'on franchit le point L de la ligne des seuils (courbe de solubilité de l'échantillon de pseudoglobuline dont on est parti). Une fois l'équilibre établi, on a séparé les deux phases représentées par les points Φ_1 et Φ_2. On a dialysé la phase surnageante Φ_1 pour en éliminer le sel, puis on l'a con-

centrée, jusqu'à ce que sa composition centésimale en protéine soit de 19,2 p. 100, c'est-.à-dire représentée à nouveau par le point A.

Comme on l'avait fait pour la solution aqueuse initiale de pseudo-

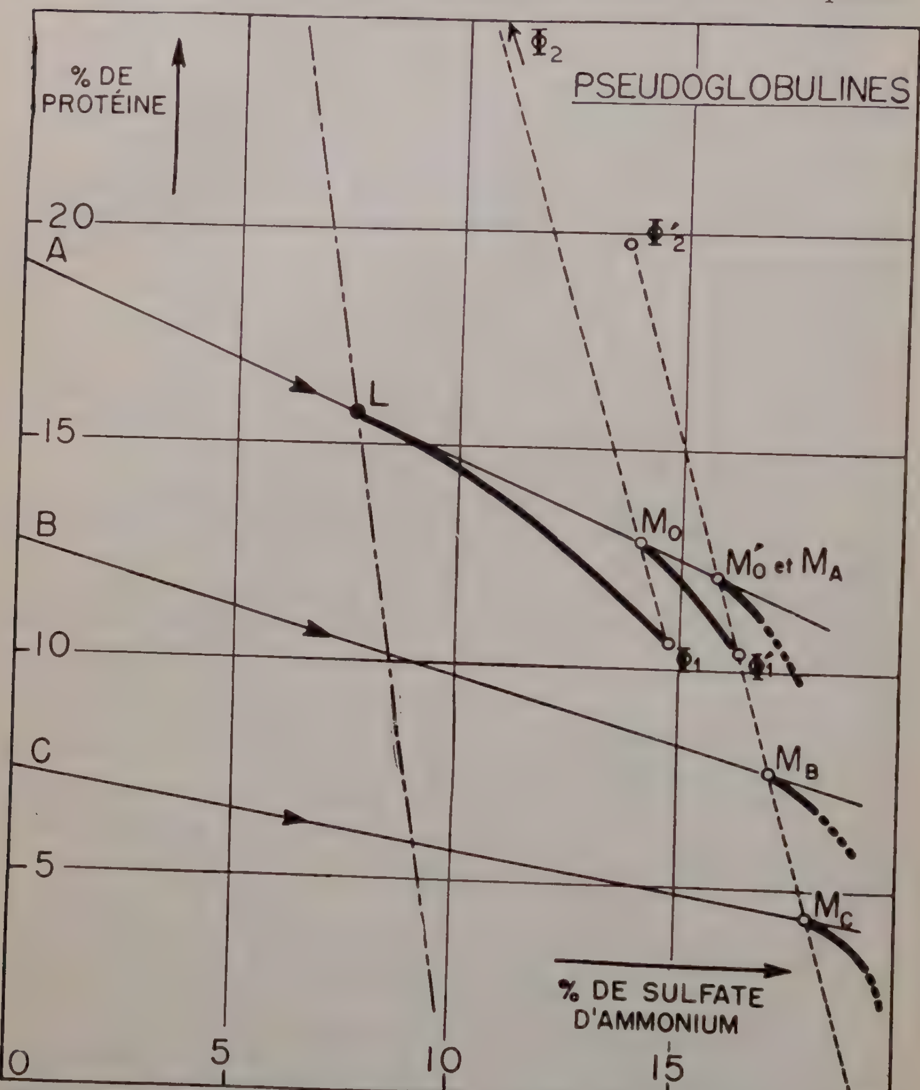


FIG. 33. — Diagramme représentant l'expérience de reprécipitation de la fraction protéique provenant d'un surnageant.

globuline, on a ajouté une solution saturée de sulfate d'ammonium à cette fraction de pseudoglobulines provenant du surnageant Φ_1, et ceci jusqu'à obtention d'un système de composition représenté par le point M'_0.

On remarque alors que le long du parcours AM'_0, la précipitation

de cette fraction débute non pas au point L mais seulement au point M_0, c'est-à-dire dès que l'on franchit la ligne de conjugaison passant par le point représentatif Φ_1 du surnageant dont on était parti.

La nouvelle phase surnageante Φ'_1 provenant du système M'_0 a été séparée, dialysée, concentrée et divisée en trois parts qu'on a amenées respectivement aux trois compositions centésimales en protéine de 19,2 p. 100, 12,7 p. 100 et 7,4 p. 100 représentées par les points A, B et C de la figure 33.

En ajoutant progressivement une solution saturée de sulfate d'ammonium à ces trois solutions aqueuses de la même fraction protéique provenant de la phase Φ'_1, on a constaté que chacune d'elles n'a commencé à précipiter que respectivement aux points M_A, M_B et M_C. Ces trois points se trouvent précisément sur la ligne de conjugaison relative au surnageant Φ'_1 d'où provenait la fraction protéique présente dans les systèmes M_A, M_B et M_C.

Conséquences immédiates : fractionnement, et solubilité des fractions.

On peut tirer quatre conclusions fondamentales des faits que nous venons de décrire.

1° L'expérience précédente prouve que *l'échantillon* de pseudoglobulines *utilisé est bien un mélange*, et non pas un corps pur. Mais surtout elle permet de démontrer avec rigueur qu'*il se produit un fractionnement au cours du relargage*. Voilà un fait bien connu, peut-être. Il est pourtant admis à la suite de considérations généralement empiriques ou intuitives. Et il a été parfois malencontreusement omis, ainsi que nous le verrons par exemple dans la théorie que Cohn a bâtie sur la solubilité des protéines dans les solutions salines (64 et 65).

S'il n'y avait pas fractionnement, les fractions protéiques qui se répartissent dans les deux phases Φ_1 et Φ_2 seraient identiques entre elles et identiques à l'échantillon initial de pseudoglobulines et la fraction provenant du surnageant Φ_1 précipiterait en L. Or elle précipite en M_0.

2° *La courbe de solubilité de la fraction protéique provenant d'un surnageant n'est autre que la ligne de conjugaison passant par le point représentatif de cette phase* (en laissant de côté le domaine particulier correspondant à des systèmes de composition globale en protéine inférieure à 1 p. 100). Autrement dit, chaque ligne de conjugaison est la courbe de solubilité de la fraction protéique dissoute dans un surnageant dont le point représentatif est situé sur cette ligne.

3° *La courbe de solubilité d'une fraction protéique quelconque* est par conséquent *une droite* (et non pas une courbe logarithmique).

4° Puisque tous les systèmes qui ont des points représentatifs situés sur la même ligne de conjugaison donnent par démixtion des sur-

nageants dont les points représentatifs sont sur cette ligne de conjugaison, *les fractions protéiques dissoutes respectivement dans chacun de ces surnageants ont même courbe de solubilité.*

On est alors tenté de présumer que ces fractions protéiques sont identiques, conclusion qui se trouve confirmée si on fait appel à des critères d'identité autres que la solubilité.

Mobilité électrophorétique des fractions.

On a préparé différents systèmes pseudoglobuline — sulfate d'ammonium-eau de points représentatifs situés sur une même ligne de conjugaison ; on a séparé les phases obtenues à partir de ces systèmes et

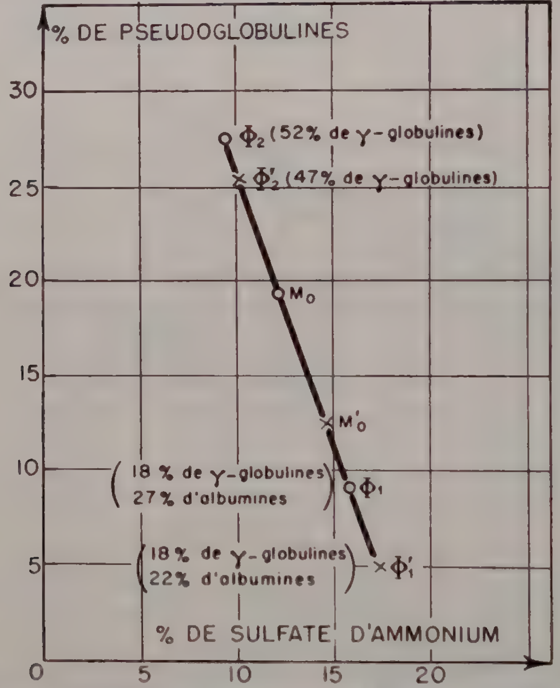


FIG. 34. — Répartition des fractions protéiques (analysées à l'électrophorèse) obtenues le long d'une même ligne de conjugaison.

soumis à l'électrophorèse les fractions protéiques présentes respectivement dans chacune de ces phases. La figure 34 donne la composition d'un tel couple de systèmes ainsi que la répartition, dans les phases, des fractions protéiques de même mobilité.

On constate que *les fractions protéiques restées dissoutes dans des surnageants dont les points représentatifs sont alignés sur la même ligne de conjugaison donnent le même diagramme d'électrophorèse* (dans les limites des erreurs expérimentales inhérentes à la méthode d'électrophorèse).

Il en est de même pour les fractions protéiques présentes dans les phases précipitées correspondantes. Dans ce dernier cas, cependant, les écarts sont un peu plus élevés, mais s'expliquent aisément par suite de l'imbibition des précipités par les surnageants.

Nous avons bien entendu vérifié que des systèmes situés sur des lignes de conjugaison différentes donnent des fractions protéiques de mobilités différentes.

Étude de la proportion de protéine ayant précipité.

Nous venons d'examiner sous deux aspects différents comment se répartissent, du point de vue qualitatif, les fractions protéiques séparées à partir de systèmes dont les points représentatifs sont alignés sur une même ligne de conjugaison.

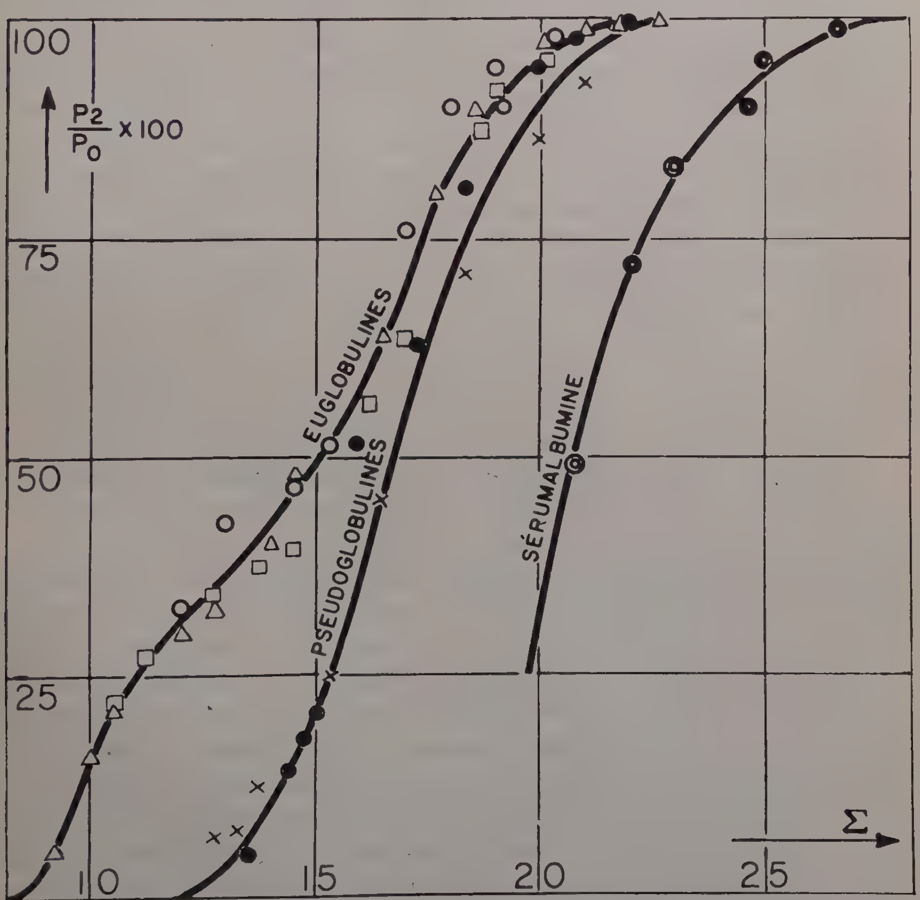


FIG. 35. — Variation de la quantité relative de protéine précipitée en fonction de la position de la ligne de conjugaison. Les cercles blancs, les triangles et les carrés concernent respectivement les trois séries d'euglobulines de la figure 11. Les points noirs et les croix concernent les deux séries de systèmes de pseudoglobulines de la figure 10. Les doubles cercles sont relatifs aux systèmes de sérumalbumine de la figure 3.

Le problème purement quantitatif se pose de savoir comment varie, le long d'une ligne de conjugaison, la proportion de protéine ayant précipité (par rapport à la quantité totale de protéine présente dans les systèmes globaux). Dans ce but, nous avons utilisé les résultats des diagrammes du chapitre II de la manière suivante.

Pour définir la position de chaque ligne de conjugaison, sur un diagramme tel que ceux des figures 3, 8, 10 et 11, le plus simple est de prendre l'abscisse Σ du point d'intersection du prolongement de la ligne de conjugaison avec l'axe des abscisses (voir fig. 15) du diagramme. D'autre part, si on se reporte aux notations que nous avons adoptées (voir fig. 2 et chap. I, p. 21), la proportion de protéine ayant précipité n'est autre que le rapport P_2/P_0.

Lorsqu'on porte sur un graphique (fig. 35) en fonction de Σ, les valeurs expérimentales du rapport P_2/P_0 trouvées pour les différentes séries de systèmes qui sont représentés sur les figures 3, 10 et 11, on constate que les points correspondant aux différentes séries se placent sur la même courbe pour un même échantillon de protéine (sérumalbumine, pseudoglobulines ou euglobulines). Le rapport P_2/P_0 n'est donc fonction que de la position de la ligne de conjugaison sur laquelle se trouve le point représentatif du système considéré.

Autrement dit, *la quantité relative de la protéine précipitée est la même pour tous les systèmes dont les points représentatifs sont sur une même ligne de conjugaison.*

Importance des lignes de conjugaison dans le fractionnement.

Puisque la relation entre la composition centésimale en sel et la composition centésimale en protéine est linéaire le long d'une ligne de conjugaison, on peut dire que *tout se passe comme s'il y avait équivalence quantitative entre protéine et sel*, une quantité donnée de sel étant équivalente (à un coefficient près) à une certaine quantité de protéine en ce qui concerne la précipitation et le fractionnement. Pour une ligne de conjugaison de pente — a, le coefficient d'équivalence n'est autre que a : une proportion donnée de sel est alors équivalente à une proportion a fois plus grande de protéine. Ceci permet d'exprimer la proportion p pour 100 de protéine présente dans un système comme étant équivalente à une proportion de sel égale à p/a pour 100. Ainsi tout système contenant p pour 100 de protéine et s de sel et dont le point représentatif est sur une ligne de conjugaison de pente — a est caractérisé par une composition équivalente en sel égale à $s + p/a$ pour 100. Bien que s et p varient le long de la ligne de conjugaison, la linéarité de la relation qui les lie entraîne la constance de la somme $s + p/a$ sur cette ligne. Or cette dernière somme

est précisément égale au paramètre Σ repérant la position des lignes de conjugaison.

On est donc conduit à attribuer au paramètre :

$$\Sigma = s + \frac{p}{a}$$

un rôle fondamental, puisqu'il suffit à lui seul pour déterminer les conditions de précipitation et de fractionnement.

La signification physique du paramètre Σ et la raison de son importance vont nous apparaître clairement grâce à des équilibres réalisés avec membrane, comme ceux qui ont été étudiés au chapitre III.

Équilibres avec membrane dans la zone de relargage et signification physique des lignes de conjugaison.

La figure 36 représente des équilibres de systèmes sérumalbumine (de bœuf)-sulfate d'ammonium-eau réalisés avec une membrane dans des conditions tout à fait comparables à celles des équilibres représentés sur les figures 21 et 22 et décrits dans le chapitre III (p. 83).

Cependant, cette fois-ci, les équilibres étudiés se cantonnent dans la zone de précipitation proprement dite ; et on a analysé non seulement la composition de la solution saline extérieure et celle du système intérieur au sac, mais aussi les compositions des deux phases intérieures au sac : surnageant et précipité. De sorte que chaque équilibre se traduit sur la figure 36 par quatre points qui représentent respectivement, en allant de bas en haut :

la solution saline extérieure Σ (sur l'axe des abscisses) ;

la phase surnageante Φ_1 intérieure au sac ;

le système intérieur au sac M (figuré par un point noir) ;

la phase précipitée Φ_2 intérieure au sac.

On constate que, pour un équilibre donné, ces quatre points sont alignés. Or la droite $\Phi_1 M \Phi_2$ n'est autre que la ligne de conjugaison relative à la démixtion du système intérieur au sac M. De telles lignes ont été tracées dans les diagrammes étudiés au cours du chapitre II, lorsqu'il y a libre diffusion des trois constituants. Quant au segment MΣ, c'est la ligne de conjugaison relative à l'équilibre des deux parties du système global situées de part et d'autre de la membrane. Les diagrammes relatifs aux équilibres avec membrane (chap. III) sont illustrés par des lignes de conjugaison de ce dernier type. L'alignement des quatre points $\Sigma \Phi_1 M \Phi_2$ sur la figure 36 montre que ces deux types de lignes de conjugaison sont confondus (fig. II *a*) ce qui n'a rien d'évident *a priori* : on aurait en effet très bien pu concevoir que les droites $\Phi_1 M \Phi_2$ et ΣM soient distinctes (fig. II *b*).

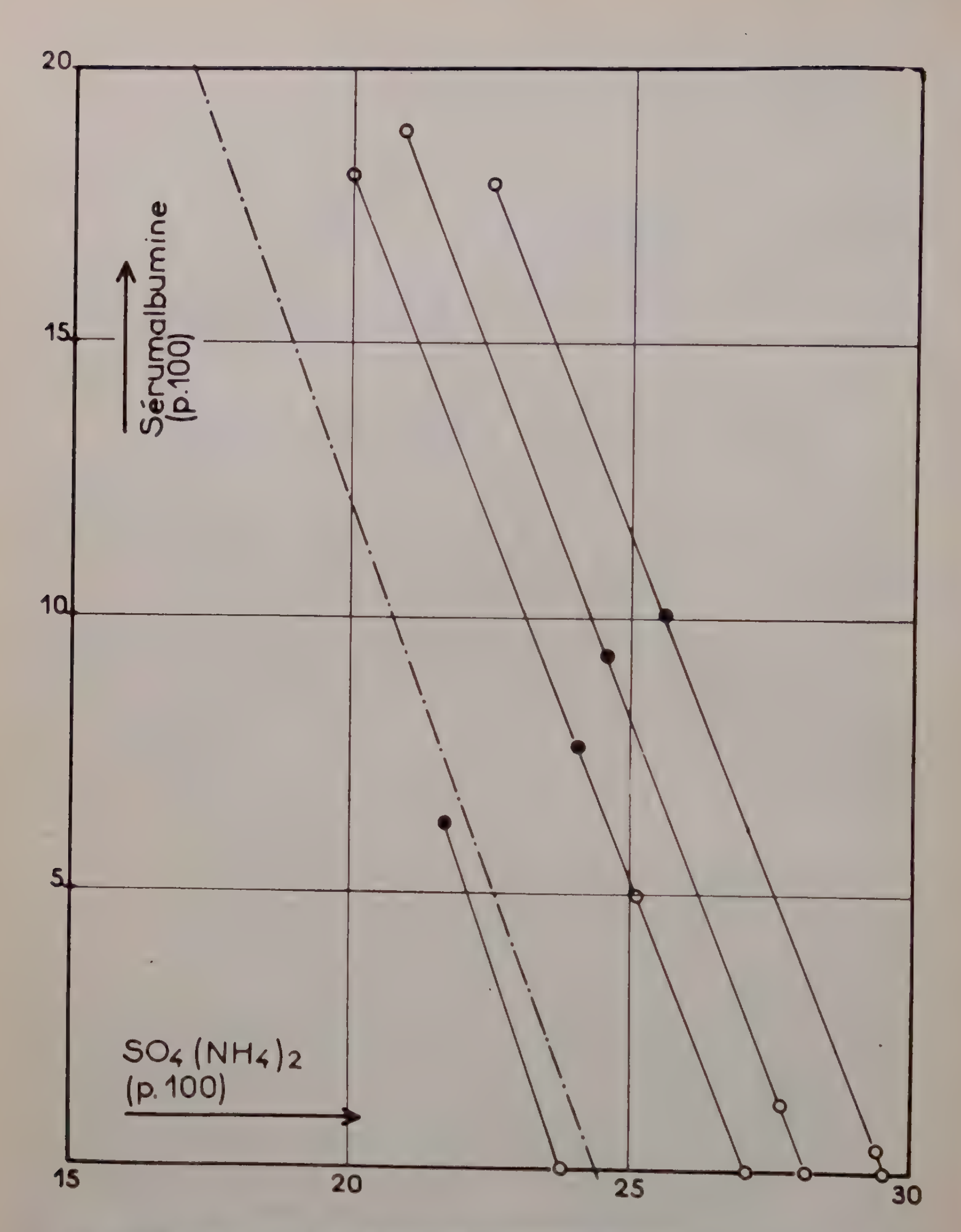


FIG. 36. — Diagrammes relatifs à des équilibres avec membranes : systèmes sérumalbumine (bœuf)-$SO_4(NH_4)_2$-eau. Pour chaque équilibre, on a quatre points qui représentent respectivement, en allant de bas en haut : La solution saline extérieure (sur l'axe des abscisses). La phase surnageante intérieure au sac. Le système intérieur au sac. La phase précipitée intérieure au sac.

Il s'ensuit que le paramètre Σ dont nous avons parlé au paragraphe précédent correspond à une grandeur concrète mesurable, à savoir la composition en sel de la solution saline qui serait en équilibre à travers une membrane avec le système considéré. Si on se reporte à ce qui a été

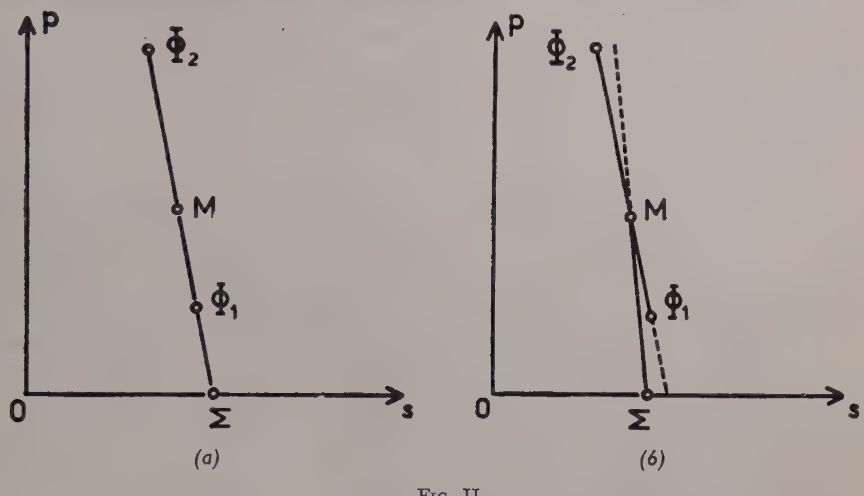


Fig. II

démontré au chapitre III, on aboutit donc, pour la signification physique du paramètre Σ à la conclusion suivante remarquablement simple : *dans les diagrammes relatifs aux équilibres protéine-sel-eau* (*avec libre diffusion des trois constituants*), *l'abscisse* Σ *du point d'intersection d'une quelconque ligne de conjugaison avec l'axe des abscisses indique la composition en sel d'une solution saline dont la concentration* (*rapport sel/eau*) *est celle du sel dans l'eau libre pour tous les systèmes et toutes les phases de points représentatifs situé sur cette ligne de conjugaison.*

De tout ceci découle la conclusion la plus importante : *les lignes de conjugaison sont les lieux des points représentant des systèmes dans lesquels la concentration du sel dans l'eau libre est constante* ; le paramètre qui varie le long d'une même ligne de conjugaison n'est autre que la proportion en hydrate de protéine.

En ce qui concerne le fractionnement, il en résulte que la proportion en hydrate de protéine n'intervient pas et qu'au contraire la concentration du sel dans l'eau est le facteur déterminant.

Nous avons vu au chapitre III que les équilibres avec membrane permettent de se rendre maître précisément du paramètre Σ. D'où l'intérêt majeur présenté par de tels équilibres en ce qui concerne le fractionnement, ainsi que nous allons le voir.

Isolement de la fraction protéique provenant d'un précipité.

L'expérience schématisée sur la figure 33 nous ayant montré que la fraction restée dissoute dans un surnageant précipitait au-delà de la ligne de conjugaison relative à ce surnageant, il était intéressant de faire une expérience comparable pour la fraction protéique provenant du précipité. Mais ceci supposait que l'on fût capable d'isoler la fraction protéique du *précipité réel*, sans entraîner de protéine du surnageant imbibant le précipité. Nous avons réussi cette opération grâce à l'emploi d'équilibres avec membrane.

Un échantillon de pseudoglobulines en solution aqueuse renfermé dans un sac à dialyse a été immergé au sein d'une solution de sulfate d'ammonium de grand volume, de composition en sel $\Sigma = 17,85$ p. 100 et de pH = 5. La ligne de conjugaison (D) ainsi déterminée se trouve en plein milieu de la zone de précipitation dont on a d'ailleurs tracé les limites (L) et (L') sur la figure 37. De sorte qu'à l'équilibre le système M intérieur au sac contient deux phases que nous avons séparées par centrifugation :

un surnageant de composition $s_1 = 15,5$ p. 100 et $p_1 = 9,15$ p. 100 représenté par un point Φ_1 ;

un précipité apparent, auquel correspond un point situé en dehors de la figure 37.

(Nous employons ici à dessein le terme de *précipité apparent* pour bien souligner le fait que nous envisageons l'éventualité d'une imbibition du précipité réel par le surnageant.)

Le précipité apparent a été remis en suspension dans un peu de la solution saline Σ, l'ensemble centrifugé, décanté et les deux nouvelles phases séparées, et ceci sept fois de suite.

Après quoi on disposait, d'une part d'un *précipité lavé* de composition représentée par le point Φ_2, d'autre part de sept solutions salines de lavage qui ont été réunies en un seul lot. Précisons tout de suite que le point Φ_2 ne représente pas la composition du précipité réel, mais celle d'un mélange entre le précipité réel et la solution saline Σ, mélange que nous appelons *précipité lavé*.

Que se passe-t-il en effet lorsque le précipité apparent est remis en suspension avec la solution saline Σ ?

Ce précipité apparent contient d'une part le précipité réel et d'autre part, éventuellement, du surnageant. Dans le surnageant, se trouve la fraction protéique soluble dans la solution saline Σ. Dans le précipité se trouve la fraction protéique insoluble dans une solution saline de composition Σ. Par des lavages répétés du précipité apparent, on va donc diluer et éliminer la fraction protéique du surnageant qui serait présente par suite de l'imbibition du précipité. En même temps, l'ensemble des

solutions salines de lavage contiendra toute la fraction protéique contenue dans la portion du surnageant qui imbibait le précipité et qui n'avait pas été séparée par centrifugation.

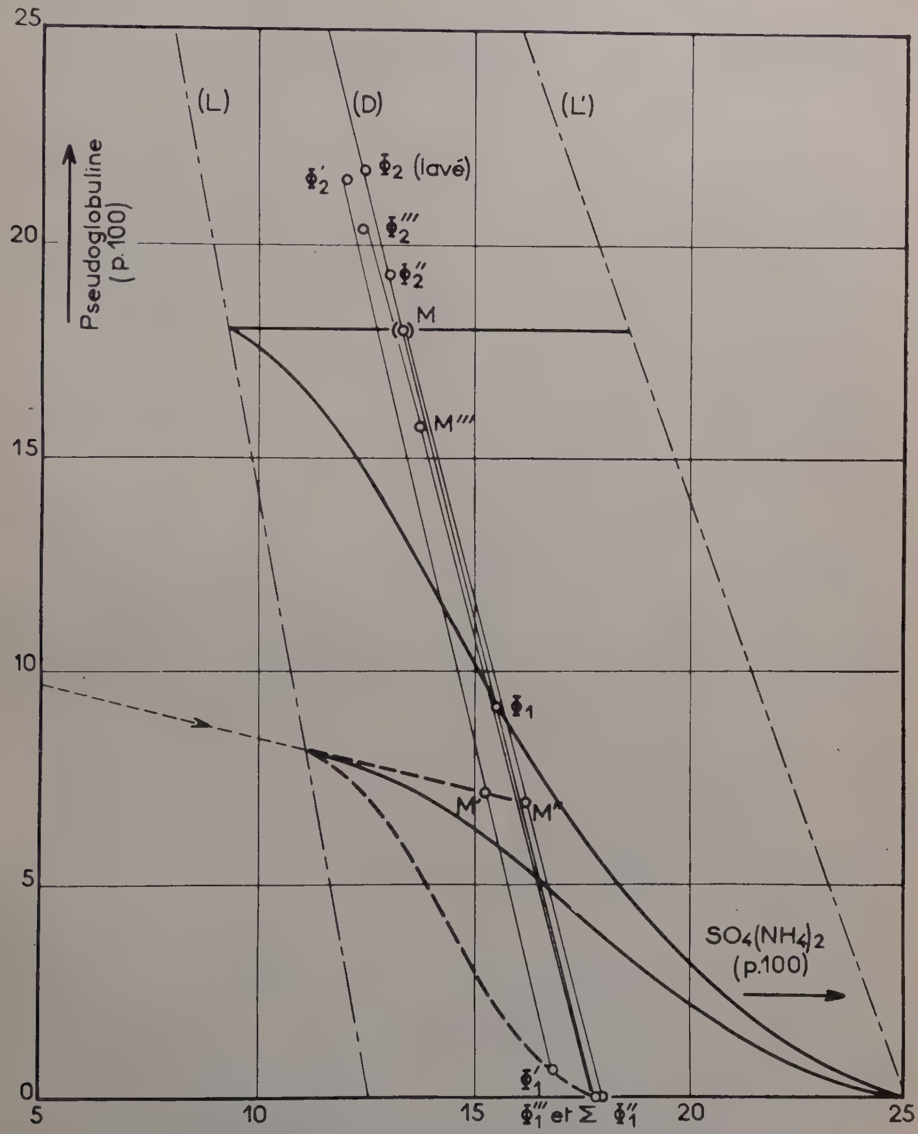


FIG. 37. — Diagramme représentant l'expérience de reprécipitation de la fraction protéique provenant d'un précipité.

Finalement, le *précipité lavé* renferme donc comme protéine exclusivement et intégralement la fraction protéique du précipité réel, c'est-à-dire la fraction insoluble du système initial M. Quant à la fraction protéique soluble du système M, c'est-à-dire celle contenue dans le

surnageant réel, elle se trouve répartie entre le premier surnageant séparé de masse apparente m_1 et les solutions salines de lavage.

Reprécipitation de la fraction protéique provenant d'un précipité.

Le précipité lavé ainsi obtenu Φ_2 a été dialysé, ce qui a donné une solution aqueuse de protéine à 11,1 p. 100 dont on fait trois parts.

Aux deux premières parts, on a ajouté progressivement une solution saturée de sulfate d'ammonium de façon à réaliser deux systèmes M' et M'' situés au voisinage de la ligne de conjugaison (D), mais de part et d'autre de celle-ci. Les phases séparées à partir de ces deux systèmes M' et M'' ont été analysées. Elles sont représentées sur la figure 37 par les points Φ'_1 et Φ''_1 pour les surnageants, Φ'_2 et Φ''_2 pour les précipités.

La troisième part a été versée dans un sac à dialyse et immergée au sein de la même solution saline Σ qui avait servi pour le système M. Le système intérieur M''' ainsi réalisé se sépare en deux phases représentées par les points Φ'''_1 et Φ'''_2.

On voit, sur la figure 37, que les surnageants Φ''_1 et Φ'''_1 relatifs aux systèmes M'' et M''' se réduisent à des solutions salines. Or M'' est un peu au-delà de la ligne de conjugaison (D) et M''' est pratiquement sur cette ligne. Ceci montre que *le lieu des points du diagramme pour lesquels une fraction protéique est intégralement précipitée n'est autre que la ligne de conjugaison passant par le point représentatif du précipité dont provient la fraction protéique.* En d'autres termes, lorsqu'une fraction protéique a été séparée par précipitation dans un système où le rapport sel/eau libre avait une valeur donnée, et que cette fraction protéique est remise seule en équilibre dans un système caractérisé par le même rapport sel/eau libre, elle précipite intégralement.

Par contre, la figure 37 montre que le surnageant Φ'_1 relatif au système M' situé en deçà de (D) contient encore de la protéine. Autrement dit, alors que les systèmes réalisés avec des pseudoglobulines totales (et de points représentatifs alignés le long de la droite M' M'') ont comme courbe des surnageants la courbe en trait plein du bas de la figure 37, les mêmes systèmes réalisés avec la fraction protéique provenant du précipité Φ_2 ont pour courbe des surnageants la courbe en pointillé.

On arrive donc à la conclusion suivante, schématisée sur la figure III.

Considérons une protéine ayant pour zone de précipitation (voir p. 71) *le secteur compris entre les droites* (*L*) et (*L'*) *que nous noterons* (*L, L'*). Lorsqu'elle se trouve partiellement précipitée et répartie dans les deux phases, précipité et surnageant, au sein d'un système M de ligne de conjugaison (D), *les zones de précipitation* des deux fractions protéiques ainsi séparées *sont représentées* respectivement *par le secteur* (*L, D*) *pour la*

acfrtion protéique provenant du précipité, et par (D, L') pour celle provenant du surnageant.

On peut résumer ceci en disant qu'*il y a additivité des zones de précipitation.*

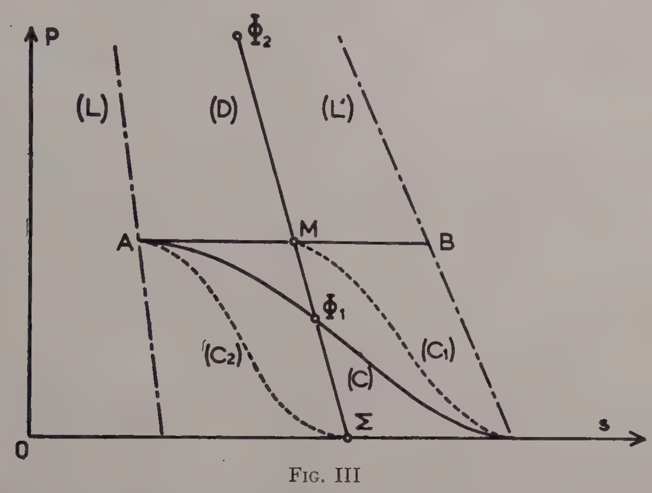


FIG. III

Les courbes (C), (C_1) et (C_2) tracées sur la figure III représentent la composition des phases surnageantes provenant de systèmes dont les compositions globales seraient alignées sur le segment AB, et qui seraient réalisés respectivement avec la protéine totale considérée, avec la fraction protéique contenue dans la phase Φ_1 et avec celle contenue dans la phase Φ_2

Masses effectives des phases et composition du précipité réel.

L'expérience résumée sur la figure 37 apporte non seulement une démonstration du fait que le précipité, tel qu'on le sépare, se trouve imbibé par du surnageant, mais aussi un moyen d'évaluer la composition des phases réelles et leurs masses effectives.

Le système M de la figure 37 avait une masse m = 33,2 g.

Le surnageant avait une composition centésimale en protéine égale à 9,15 p. 100 (sa composition est représentée par le point Φ_1). Et la portion de surnageant séparée par centrifugation avait une masse m_1 = 15,5 g et contenait 1,384 g de protéine.

Enfin, l'ensemble des solutions salines ayant servi au lavage du précipité contenait 1,157 g de protéine.

Par conséquent, le surnageant total renfermait 1,384 + 1,157 = 2,541 g de protéine et comme sa composition centésimale en protéine (9,15 p. 100) est connue grâce à l'analyse d'une partie aliquote, on en déduit que sa masse était égale à $\frac{2{,}541 \times 100}{9{,}15} = 27{,}8$ g (et non pas 15,5 g).

Il en résulte que la masse du précipité réel est égale à : 33,2 — 27,8 = 5,4 g.

On connaît donc ainsi les masses exactes des phases, bien qu'on ne soit pas en mesure de les séparer intégralement l'une de l'autre. Si on a la composition du système global et celle du surnageant, c'est-à-dire les positions des points M et Φ_1, on peut en déduire la composition exacte du précipité.

Dans l'expérience que nous relatons, la composition du système global n'est malheureusement connue qu'avec une large approximation (cette incertitude sur la position de M est symbolisée par des parenthèses sur la figure 37). Aussi pouvons-nous tout au plus dire entre quelles limites se trouve certainement le point Φ_2 représentant le précipité réel du système M. On sait déjà que le point Φ_2 est sur la droite (D) et que son ordonnée est inférieure ou égale à 75 p. 100 de protéine. D'après l'expérience précédente, on sait en outre que son ordonnée est certainement comprise entre 50 et 65 p. 100. Contrairement à ce qu'on aurait peut-être pu supposer, le point Φ_2 est nettement distinct du point π foyer de convergence des lignes de conjugaison.

Autrement dit, la phase formée par le précipité ne se réduit pas à de l'hydrate de protéine, mais elle contient les trois constituants : protéine, sel et eau.

Par suite, sur les diagrammes de phases étudiés au chapitre II (fig. 3, 8, 10 et 11), à une courbe donnée des surnageants correspond bien une courbe des précipités, mais cette dernière est nettement au-dessus de la courbe des précipités apparents qui a été tracée dans chaque cas, et nous savons maintenant par quelle méthode l'obtenir.

Fractionnement et purification.

Au moment où nous décrivons ce travail, les expériences que nous sommes en mesure de relater s'arrêtent ici.

Sans vouloir diminuer l'importance des résultats obtenus, il n'en reste pas moins vrai que les expériences que nous avons pu effectuer jusqu'ici ne constituent qu'une marche d'approche dans la voie de la purification des protéines : les notions de solubilité et d'insolubilité ont été précisées ; le fractionnement a été mis en évidence et analysé avec autant de rigueur qu'il était possible ; et une méthode bien définie se trouve maintenant au point qui permet de tracer des diagrammes de phases absolument rigoureux quant aux compositions des phases, bien qu'on ne puisse séparer ces dernières ; cette même méthode fournit surtout un moyen de fractionner les protéines.

Reste à savoir si ce fractionnement conduit ou non à une purification. Il ne faut en effet pas confondre fractionnement et purification.

Lorsqu'on distille un mélange azéotrope de deux constituants, on recueille à chaque température un mélange différent. Mais, bien que la composition du mélange varie avec la température, on ne recueillera jamais de corps pur. Tout au plus pourra-t-on aboutir à un mélange plus riche que tous les autres en l'un des constituants : il y a fractionnement, mais non purification.

Le problème se pose donc, pour les protéines, de savoir si le fractionnement par les sels, mené de façon systématique, permet un enrichissement toujours plus grand en ce que nous avons appelé une fraction protéique élémentaire, ou non. Telle est une des questions importantes que nous nous proposons d'attaquer ultérieurement.

2. — Discussion.

Les résultats que nous venons d'exposer dans ce chapitre sont parfois en contradiction avec ceux de travaux antérieurs bien connus. Mais, ainsi que nous allons le voir maintenant, ils permettent de comprendre les raisons de ces contradictions et, surtout, ils fournissent l'explication de nombreuses conclusions apparemment insolites auxquelles aboutissent différents auteurs à propos des problèmes difficiles posés par la solubilité des protéines, leur fractionnement, leur purification et l'application de la règle des phases aux systèmes protéine-sel-eau.

Loi de Cohn et solubilité des protéines dans les solutions salines.

Un nombre considérable de travaux ont été effectués sur la solubilité des protéines. Depuis une trentaine d'années, l'immense majorité d'entre eux ont été entrepris pour appliquer ou vérifier la théorie émise par Cohn. Nous commencerons par analyser cette théorie et montrer qu'elle repose sur plusieurs erreurs.

En 1924, dans une courte note, Cohn (64) expose comment, sur les conseils de Sörensen, il s'est proposé d'appliquer aux protéines une relation sur la solubilité suggérée par Brönsted. En désignant par s la solubilité de la protéine et par m la force ionique du milieu, il est ainsi amené à proposer une relation aujourd'hui bien connue, d'après laquelle le logarithme de la solubilité serait une fonction linéaire de la force ionique :

$$\log s = a m + b.$$

A l'occasion d'une mise au point sur la physicochimie des protéines (65), il expose en détail en 1925 comment les résultats expérimentaux de Chick et Martin (5) et de Sörensen (18, 19 et 66) paraissent confirmer la validité de cette relation. Il en déduit qu'à chaque protéine doit cor-

respondre un couple de valeurs particulières des coefficients *a* et *b* de la relation et que ces valeurs doivent permettre de caractériser les différentes protéines.

En quoi cette théorie est-elle incorrecte ?

1° Nous avons vu aux chapitres II et IV que les courbes donnant les compositions des phases surnageantes ne sont pas des courbes de solubilité. En effet, *les points de ces courbes des surnageants indiquent bien la quantité de protéine dissoute en fonction de la composition ou de la concentration en sel. Mais comme il se produit un fractionnement, ces différents points sont relatifs à des fractions protéiques différentes.* Le terme de solubilité est donc impropre en pareil cas, puisqu'aucun point de la prétendue courbe de solubilité ne concerne la même substance.

Cette erreur s'explique peut-être par le fait que Sörensen avait cru démontrer l'unicité de la courbe des surnageants (voir p. 75) ; or nous avons vu qu'on obtient autant de courbes de surnageants différentes qu'il y a de séries linéaires de systèmes initiaux (fig. 10 et 11). Pourtant, en 1925, Sörensen commence à penser qu'il se produit un fractionnement ; il en fait la remarque à propos des pseudoglobulines (67), puis la généralise aux autres protéines quelques années après (68).

2° La loi de Cohn ne rend compte de la teneur en protéine que pour la fin de la précipitation, c'est-à-dire aux fortes concentrations salines et aux faibles teneurs en protéine, ainsi que Cohn a pris le soin de le préciser.

Les diagrammes de phases que nous avons tracés montrent que les courbes des surnageants ont toujours une forme d'S étiré, et qu'elles ne présentent en aucun cas une allure logarithmique. Ce n'est donc que pour la portion de ces courbes située au-delà de leur point d'inflexion que la relation de Cohn peut à la rigueur s'appliquer.

3° Enfin et surtout, rien ne permet de penser que les coefficients *a* et *b* seraient caractéristiques d'une protéine, et la manière dont on a usé de cette relation comme critère de pureté est très regrettable.

L'attrait d'une relation aussi simple applicable à des substances compliquées comme les protéines a été en effet considérable, et on a essayé de vérifier cette loi avec à peu près toutes les protéines : Macheboeuf et Sörensen (69) avec l'ovalbumine, Florkin (70) avec le fibrinogène, Green (71) avec l'hémoglobine, Morgan (72) avec le myoglobine, Tenow et Snellman (73) avec le myosine, etc. sans que les mesures faites apportent jamais aucun élément positif.

Le seul et unique travail qui ait failli aboutir à la détermination des courbes de solubilité des protéines est celui de Galeotti (4) dont nous avons déjà eu l'occasion de parler plus haut (Chap. II, p. 73 et fig. 16). La figure 16 sur laquelle nous avons réuni deux courbes que Galeotti n'a pas rapprochées l'une de l'autre, traduit déjà par elle seule la diffé-

rence entre une courbe de solubilité d'une protéine et une courbe donnant la composition de la phase dissoute ; en même temps elle conduit à supposer qu'il y a fractionnement, contrairement aux hypothèses faites par GALEOTTI.

Fractionnement lors du relargage.

Pour montrer qu'il se produit un fractionnement au cours de la précipitation des protéines par les sels, SÖRENSEN a opéré de la façon suivante avec des pseudoglobulines (66).

Il fait (*loc. cit.*, p. 24) « des expériences dans lesquelles il commence par précipiter une certaine quantité de protéine, puis poursuit ensuite la précipitation d'une partie du surnageant en présence du précipité et celle d'une autre partie du surnageant en l'absence du précipité (après filtration) ». Dans les deux cas, il arrête la précipitation pour une même valeur de la concentration du sulfate d'ammonium dans l'eau libre, et trouve que la concentration en protéine est plus faible dans le surnageant où la précipitation a été poursuivie en présence du premier précipité formé que dans celui qui a été séparé du premier précipité formé.

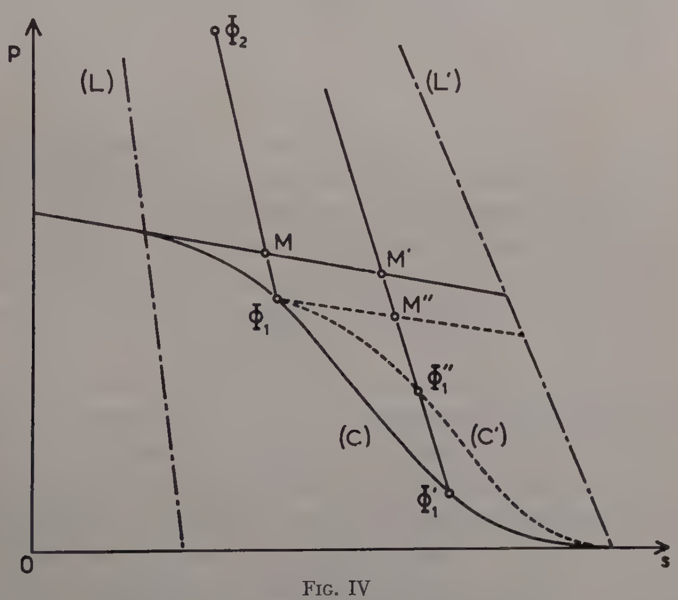


FIG. IV

Pour comprendre l'expérience de SÖRENSEN, nous l'avons traduite sur un diagramme triangulaire (fig. IV).

SÖRENSEN réalise d'abord un système M, donnant un surnageant Φ_1 et un précipité Φ_2. Dans le premier cas, il poursuit la précipitation du système global jusqu'à obtention du système M' qui donne le surnageant Φ'_1 situé sur la même courbe de surnageant (C) que le point Φ_1. Dans

le deuxième cas, il sépare Φ_2 de Φ_1 et ajoute au surnageant Φ_1 une solution saturée de sulfate d'ammonium jusqu'à obtention du système M'' situé sur la ligne de conjugaison $M'\Phi'_1$. Le surnageant Φ''_1 ainsi obtenu est sur la courbe de surnageants (C') qui, d'après ce que nous avons vu plus haut (fig. 33) est située au-dessus de (C).

SÖRENSEN en déduit qu'un fractionnement se produit, ce qui est parfaitement exact : s'il n'y avait pas fractionnement, les points Φ'_1 et Φ''_1 seraient confondus. Mais il va plus loin et conclut que ce fractionnement apparaît comme dû à une action réciproque entre les fractions protéiques du précipité et celles du surnageant ; non seulement cette dernière remarque n'est pas prouvée par l'expérience de SÖRENSEN mais elle est absolument contraire aux résultats que nous avons obtenus : l'expérience résumée sur la figure 33 prouve en effet que *le fractionnement est absolument indépendant du fait qu'on opère ou non en présence du précipité.* La courbe de solubilité de la fraction protéique contenue dans un surnageant reste la même en présence comme en l'absence de la phase précipitée.

Ici encore, l'erreur commise par SÖRENSEN provient du fait qu'il confond courbe des surnageants et courbe de solubilité.

Expérience de dissolution fractionnée de Steinhardt.

La même confusion conduit STEINHARDT à parler des « anomalies de la solubilité des protéines cristallisables » (74). Au lieu de relarguer, STEINHARDT opère en sens inverse : il dissout un précipité cristallin.

Il met des cristaux de pepsine en équilibre avec un volume v de solution saline (cette dernière étant à une concentration saline suffisamment faible pour dissoudre une partie de la pepsine), mesure la concentration en protéine du surnageant ainsi obtenu, essore les cristaux non dissous, c'est-à-dire la phase précipitée, les met en présence d'un nouveau volume v de la même solution saline, analyse encore le surnageant à l'équilibre et ainsi de suite. Il constate que les différents surnageants successifs contiennent de moins en moins de protéine ; ceci est purement occasionnel, car l'examen sur un diagramme des opérations ainsi effectuées montre que suivant les valeurs du rapport (masse des cristaux)/(masse du volume v de solution saline), tous les cas sont possibles : la proportion de protéine dans les surnageants successifs peut croître, décroître, ou même ne pas varier de façon monotone.

D'autre part, il assimile la teneur en protéine des différents surnageants à une solubilité, oubliant qu'il se produit un fractionnement, et conclut ainsi que la solubilité de la pepsine varie de façon insolite puisqu'elle semble dépendre de la quantité de protéine présente.

Juxtaposition des zones de précipitation.

Nous avons vu que, lorsqu'on précipite partiellement un échantillon de protéine, les deux fractions contenues dans chacune des phases ont comme zones de précipitation des secteurs contigus dont l'ensemble n'est autre que la zone de précipitation de l'échantillon considéré.

Cette additivité des zônes de précipitation est à rapprocher de celle trouvée par DERRIEN et ROCHE (75) pour la composition en protéine d'un surnageant, lors du relargage d'un échantillon constitué par un mélange de deux protéines nettement distinctes : la cristalbumine de cheval et l'hémoglobine de chien.

Purification des protéines.

Dans la méthode qu'il indique pour la préparation de l'ovalbumine, SÖRENSEN (1) emploie, pour laver les cristaux, un procédé qu'il est intéressant d'analyser.

Il prépare une série de solutions de sulfate d'ammonium de concentrations croissantes c_1, c_2, ..., c_k, ..., c_n. Dans un échantillon de chacune de ces solutions, il verse un peu de la liqueur mère qui était en équilibre avec les cristaux considérés. Si c_k est la concentration saline la plus faible pour laquelle la liqueur mère précipite, c'est avec une solution saline de concentration c_{k-1} que SÖRENSEN lave sur filtre ses cristaux.

La marche ainsi suivie s'interprète aisément sur un diagramme de phases.

Désignons par Σ_k et Σ_{k-1} les compositions en sel des solutions de concentration c_k et c_{k-1} et par Σ l'abscisse à l'origine de la ligne de conjugaison relative à l'équilibre cristaux-liqueur mère considéré. Puisque la liqueur mère est soluble dans une solution saline de composition Σ_{k-1} et insoluble dans une solution saline de composition Σ_k, c'est que l'on a :

$$\Sigma_{k-1} < \Sigma < \Sigma_k$$

Or, nous avons montré que pour purifier les protéines d'un précipité il faut laver ce dernier avec une solution saline de composition indiquée par l'abscisse à l'origine de la ligne de conjugaison relative à ce précipité.

Le procédé de SÖRENSEN consiste donc à encadrer la valeur Σ par deux valeurs approchées et à utiliser une solution saline ayant pour composition la plus petite de ces deux valeurs. On mesure une fois de plus l'intuition admirable qui guidait SÖRENSEN.

Chose curieuse, il ne semble pas que l'intérêt du procédé ait été compris, car aucun auteur, à notre connaissance, n'a jamais répété cette opération et aucune des méthodes modernes de préparation des protéines par relargage n'en fait mention.

Grâce aux équilibres avec membrane, on comprend ainsi toute l'importance de ce qui a pu passer pour un détail de préparation. En même temps, la méthode des équilibres avec membrane permet une mise en pratique encore plus précise du procédé pressenti par SÖRENSEN, puisqu'elle fournit le moyen de laver le précipité avec une solution saline ayant exactement la composition voulue, et évite l'approximation faite par SÖRENSEN.

Cette méthode de lavage des précipités est peut-être plus importante et nécessaire qu'on ne le soupçonne, surtout lorsqu'il s'agit d'extraire, au sein d'un mélange de protéines, celles qui sont les moins solubles dans les solutions salines. Nous avons en effet déjà eu l'occasion d'insister sur le fait que, lors du relargage, la seule phase dont on sépare une partie intégralement de l'autre est le surnageant, c'est-à-dire la phase contenant les fractions les plus solubles : quand, par exemple, on précipite le sérum sanguin par demi-saturation en sulfate d'ammonium, on a d'une part un surnageant contenant des albumines, ou tout au moins uniquement des fractions solubles à demi saturation, d'autre part un mélange de précipité et de surnageant contenant des globulines et des albumines, c'est-à-dire des fractions de toute nature au point de vue solubilité. Faut-il voir là une des raisons pour lesquelles on arrive toujours à mieux purifier les albumines que les globulines ? ou bien les causes sont-elles plus complexes. Seules des expériences faites dans cette direction et par la méthode indiquée pourront en décider.

Importance de la concentration en protéine dans l'extraction par relargage.

Indépendamment de la possibilité de séparer les fractions protéiques des différentes phases (à défaut d'une séparation des phases elles-mêmes), un facteur important intervient dans le fractionnement : la concentration en protéine.

Des travaux tels que ceux de BUTLER et MONTGOMERY (76) ont clairement mis en évidence son influence et les expériences que nous avons décrites en apportent la confirmation. Mais si on admet aujourd'hui que la proportion de protéine intervient, on ignore dans quelle mesure et comment. La réponse à cette question nous est donnée par les diagrammes de phases.

On voit en effet, sur ces diagrammes, que les fractions protéiques précipitées ne sont pas identiques lorsque, suivant l'habitude qui est répandue, on se contente de fixer la composition saline globale de relargage, c'est-à-dire lorsqu'on se place sur une verticale du diagramme. Pour précipiter une fraction protéique déterminée, il faut d'autant plus de sel qu'il y a moins de protéine. Plus précisément, *nous savons qu'il faut se placer sur une même ligne de conjugaison pour obtenir les mêmes fractions protéiques.*

Cette nécessité s'explique d'abord par l'hydratation des protéines, ainsi que SÖRENSEN avait été conduit à le supposer (17) ; *ensuite par le fait que, pour une même valeur du rapport sel/eau libre, la concentration en hydrate de protéine dans l'eau libre n'intervient pas dans le fractionnement — mais influe seulement sur la composition des phases en équilibre,* contrairement à ce que SÖRENSEN croyait avoir montré (18).

En pratique, pour fractionner convenablement, on dispose de deux méthodes. On peut établir un diagramme de phases sommaire de l'échantillon de protéine étudié, ou, ce qui revient au même, déterminer la valeur de l'hydratation. Mais, ainsi que nous l'avons montré, il est plus commode et plus sûr d'utiliser les équilibres avec membrane, qui dispensent de connaître la concentration en protéine à laquelle on se place : la composition de la solution saline extérieure impose automatiquement la ligne de conjugaison du système. En même temps, cette solution a exactement la composition que doit avoir la solution destinée au lavage du précipité.

Application de la règle des phases aux systèmes protéine-sel-eau.

L'application de la règle des phases de GIBBS, jadis très controversée pour les systèmes colloïdaux, nécessite d'abord de bien préciser les caractéristiques des systèmes envisagés.

L'évaluation de la composition réelle du précipité nous a confirmé que la phase précipitée, qu'elle soit ou non isotrope contient, comme la phase soluble, les trois constituants : protéine, sel et eau ; la protéine étant présente dans les deux phases sous la forme du même hydrate. D'autre part, nous savons que la composition des deux phases dépend de celle du système global ; en effet, elle varie non seulement pour des systèmes situés sur deux lignes de conjugaison différentes, mais aussi pour des systèmes ayant même ligne de conjugaison.

En ce qui concerne le précipité, il faut donc abandonner les conceptions de SÖRENSEN qui semblait bien penser (17) — il s'est d'ailleurs plusieurs fois contredit — que les cristaux étaient constitués uniquement par de l'hydrate de protéine. Au contraire, les idées de SPIRO (9), reprises ensuite par LANGMUIR (77) et précisées par DUCLAUX (52) et DERVICHIAN (78) se trouvent pleinement confirmées : l'équilibre précipité-surnageant est tout à fait comparable à l'équilibre de deux phases liquides du point de vue de la variation de composition des phases.

L'analogie ne doit cependant pas être poussée trop loin. En effet, si la protéine était un constituant unique, les systèmes protéine-sel-eau comportant deux phases n'auraient qu'un seul degré de liberté, d'après la règle de GIBBS ; un seul paramètre suffirait alors à déterminer les compositions des deux phases, et, sur les diagrammes, on ne trouverait qu'une courbe et une seule indiquant la composition du précipité, et

une courbe et une seule pour la composition de la phase soluble ; cette dernière courbe serait en même temps le lieu des seuils de précipitation, ou encore la courbe de solubilité de la protéine considérée, puisque tous les points de cette courbe concerneraient la même protéine unique. De telles modalités caractérisent par exemple l'équilibre entre deux phases liquides provenant de la démixtion des systèmes alcool-sel-eau.

Or, *dans les systèmes protéine-sel-eau*, des compositions différentes de la phase précipitée comme de la phase soluble peuvent être obtenues à partir de systèmes différents ayant même ligne de conjugaison. En même temps, *les courbes donnant les compositions des surnageants sont nettement distinctes de la courbe de solubilité de l'échantillon de protéine considéré.* Ceci est dû au fait que *la protéine n'est pas un constituant unique, mais un mélange dont les constituants élémentaires se répartissent qualitativement de façon différente dans les phases en équilibre, et quantitativement de façon variable suivant les compositions de ces phases.*

Aussi n'y a-t-il aucune contradiction entre l'application de la règle des phases à de tels systèmes et les résultats fournis par l'expérience : contrairement à ce qu'Ostwald et Köhler (7) ont cru, on a parfaitement le droit de tracer des lignes de conjugaison (voir p. 77) et d'appliquer la règle des phases avec ces systèmes. Ainsi que l'a montré Dervichian dans une analyse critique détaillée des exemples connus (25) il n'apparaît en aucun cas que les systèmes colloïdaux échappent aux lois ordinaires de la chimie. Mais les phénomènes sont un peu moins simples que ne le pensait Sörensen (18), car le désir de montrer que la règle des phases s'appliquait aux systèmes ovalbumine-sel-eau a conduit ce dernier à simplifier les faits de façon erronée, comme nous l'avons vu plus haut (voir p. 75).

Si on a le droit d'appliquer la règle des phases, on manque en revanche de données pour le faire : on ignore d'abord le nombre de fractions protéiques élémentaires, donc le nombre de constituants réels ; ensuite, parmi ces derniers, on ne sait pas combien sont indépendants. On peut en tout cas s'attendre à un nombre de degrés de liberté très grand. Pourtant l'examen des diagrammes montre qu'il suffit de connaître la position, sur la ligne de conjugaison, du point représentant le système global considéré pour que soient déterminés les points représentatifs des phases : il suffit par conséquent de fixer, en plus de Σ qui définit la ligne de conjugaison, un autre paramètre comme, par exemple, la distance du point représentant le système global au point π de convergence des lignes de conjugaison.

L'expérience aboutit donc à une conclusion beaucoup moins compliquée que ne le laisserait prévoir l'application aveugle de la règle des phases. Ceci s'explique peut-être par le fait que l'hétérogénéité d'une

protéine (comme par exemple la séurmalbumine) est quelque chose de très relatif.

Les fractions protéiques élémentaires d'un même échantillon de protéine sont en effet, sinon identiques, du moins très voisines les unes des autres. Cette idée a d'ailleurs conduit BONOT (79) à tenter d'appliquer aux protéines la théorie de l'homéomérie. Aussi la différence entre deux fractions protéiques élémentaires provenant de la même protéine est-elle probablement négligeable par rapport à celle existant entre une fraction protéique élémentaire et une substance telle que le sulfate d'ammonium. De sorte que, parmi les multiples paramètres pouvant théoriquement intervenir dans les équilibres des systèmes protéine-sel-eau, le nombre de ceux qui, en première approximation, entrent en jeu de façon efficace est faible ; et les autres n'interviennent peut-être que statistiquement.

Hétérogénéité et cristallisation des protéines.

La même idée permet de comprendre pourquoi des protéines qui sont des substances hétérogènes peuvent parfaitement bien cristalliser : le cristal de protéine est comparable à une cité dont les maisons auraient été toutes bâties sur le même plan, à quelques détails près et seraient disposées régulièrement les unes par rapport aux autres. Vue d'avion, la cité paraîtrait une répétition parfaite à deux dimensions du même motif constitué en l'occasion par une maison. Vue de près, aucune maison n'est exactement semblable aux autres.

De même, le cristal est une répétition à trois dimensions du même motif constitué par la molécule protéique et la similitude entre les molécules est suffisante pour que leur arrangement puisse avoir une structure périodique.

La possibilité de cristalliser est donc la garantie d'un minimum d'homogénéité, mais d'une homogénéité toute relative. Et il ne faut pas s'hypnotiser sur la cristallisation puisque des critères comme la solubilité, telle que nous l'avons définie, ou simplement la composition des phases, s'avèrent susceptibles de détecter des différences entre des fractions protéiques élémentaires très voisines, là où la cristallisation ne fait aucune distinction.

3. — Conclusions.

Nous résumerons les points acquis au cours du présent chapitre.

La solubilité des protéines dans les solutions salines, définie en tant que solubilité d'un mélange, a été étudiée. On a montré qu'elle varie

linéairement en fonction de la concentration saline et que la loi logarithmique de COHN est relative à la superposition de deux phénomènes différents : la variation de la répartition des fractions protéiques dans les phases, et la variation de la solubilité de ces fractions.

La courbe de solubilité de la fraction protéique restée dissoute dans un surnageant lors d'une précipitation partielle est une droite confondue avec la ligne de conjugaison relative au surnageant considéré (pour des compositions globales en protéine supérieures ou égales à 1 p. 100).

En ce qui concerne le fractionnement, on a démontré que les fractions protéiques séparées par précipitation — d'une part celles restées dissoutes, d'autre part celles précipitées — sont respectivement identiques pour tous les systèmes de points représentatifs situés sur une même ligne de conjugaison : ces fractions (celles restées dissoutes, par exemple), ont même courbe de solubilité, même diagramme d'électrophorèse, et sont présentes dans les mêmes proportions. On a établi que les lignes de conjugaison relatives aux diagrammes de phases sont, comme celles relatives aux équilibres avec membrane, les lieux des points pour lesquels la concentration du sel dans l'eau libre est constante.

Il en résulte que la concentration en hydrate de protéine dans l'eau libre n'intervient pas dans le fractionnement, c'est-à-dire dans la répartition des fractions protéiques dans les phases, mais influe seulement sur la composition des phases en équilibre.

Quand on précipite partiellement une protéine, la ligne de conjugaison relative à l'équilibre en jeu partage la zone de précipitation de la protéine considérée en deux parties qui sont les zones de précipitation respectives des fractions protéiques séparées dans la phase précipitée et dans la phase soluble.

L'imbibition du précipité par le surnageant — après séparation par centrifugation des phases apparentes — a été démontrée, et son importance évaluée. On a ainsi pu mesurer les compositions des phases réelles et réaliser la séparation des fractions protéiques contenues dans ces phases.

On a, en particulier, pu confirmer le fait que la phase précipitée contient, comme la phase soluble, les trois constituants protéine, sel et eau.

Enfin, l'expérience a montré qu'en première approximation, le nombre des paramètres déterminant les équilibres des systèmes protéine-sel-eau est beaucoup plus restreint que ne le laisse prévoir la règle des phases, ce qui conduit à supposer que plusieurs de ces paramètres interviennent de façon statistique.

(à suivre)

RÉSUMÉ

On a étudié les caractéristiques des équilibres des systèmes protéine-sel-eau lorsque la protéine peut diffuser soit dans tout le système (équilibres de phases), soit dans une moitié du système (équilibres avec membrane semiperméable).

On a établi pour la première fois et de façon systématique, des diagrammes ternaires rassemblant avec rigueur et concision les caractéristiques des systèmes protéine-sel-eau et étudié le rôle des différents paramètres intervenant dans ces équilibres. Ces diagrammes relatifs à des systèmes comportant un constituant colloïdal et macromoléculaire ont été comparés à ceux que l'on connaît pour des systèmes de trois constituants purs et bien définis (du type savon-sel-eau, ou alcool-sel-eau).

Les limites des différents domaines d'existence des phases ont été précisées ; elles sont distinctes des courbes donnant la composition des phases qui, elles-mêmes, sont multiples (contrairement à ce qui se passe avec trois constituants purs). Mais le faisceau des lignes de conjugaison est unique et constitue l'élément le plus important de ces diagrammes.

L'étude des équilibres avec membrane a permis de tracer des diagrammes du même type que les précédents, indiquant la composition des deux parties du système séparées par une membrane. On a démontré l'identité des lignes de conjugaison joignant les points des couples ainsi obtenus (points représentant les compositions des deux parties en équilibre de part et d'autre de la membrane) avec les lignes de conjugaison des diagrammes de phases.

Une méthode comparable à la « méthode des restes » de SCHREINEMAKERS a ainsi été mise au point permettant la détection et l'analyse de composés formés entre de grosses molécules et les constituants d'un mélange binaire.

Par l'application de cette méthode aux mélanges protéine-sel-eau, on a démontré l'existence et mesuré la proportion d'eau liée aux protéines (en tant qu'eau non solvante vis-à-vis des ions). On a trouvé 0,33 g d'eau liée par gramme de sérumalbumine de bœuf.

Que la protéine soit cristallisée ou amorphe, qu'elle soit précipitée ou dissoute, on trouve toujours la même quantité d'eau liée. L'existence et la composition de l'hydrate de protéine ne dépendent donc pas de l'état d'ordre ou d'agrégation dans lequel se trouve la protéine. En revanche, ils sont fonction de facteurs tels que le pH (l'hydratation augmente avec le pH en milieu acide) et la nature des ions présents dont on a étudié l'influence.

La signification des lignes de conjugaison a été explicitée : elles sont les lieux des points représentant les mélanges dans lesquels la concentration du sel dans l'eau libre garde une valeur constante. Le paramètre variable le long d'une même ligne de conjugaison est alors la concentration du mélange en hydrate de protéine.

La solubilité des protéines dans les solutions salines, définie en tant que solubilité d'un mélange, a été étudiée quantitativement. On a démontré qu'elle varie linéairement en fonction de la concentration saline et que la loi logarithmique due à E. J. COHN est relative à la superposition de deux phénomènes différents : la variation de la répartition qualitative des fractions protéiques dans les phases, et la variation quantitative de la solubilité de ces fractions.

La courbe de solubilité de la fraction protéique restée dissoute dans un surnageant lors d'une précipitation partielle est une droite confondue avec

la ligne de conjugaison relative au surnageant considéré (pour des compositions globales en protéine supérieures ou égales à 1 p. 100).

En ce qui concerne le fractionnement, on a démontré que les fractions protéiques séparées par précipitations — d'une part, celle restées dissoutes, d'autre part, celles précipitées — sont respectivement identiques pour tous les systèmes de points représentatifs situés sur une même ligne de conjugaison : ces fractions (celles restées dissoutes, par exemple), ont même courbe de solubilité, même diagramme d'électrophorèse, et sont présentes dans les mêmes proportions.

Il en résulte que la concentration en hydrate de protéine dans l'eau libre n'intervient pas dans le fractionnement, c'est-à-dire dans la répartition qualitative des fractions protéiques dans les phases, mais influe seulement sur la composition des phases en équilibre.

Quand on précipite partiellement une protéine, la ligne de conjugaison relative à l'équilibre en jeu partage la zone de précipitation de la protéine considérée en deux parties qui sont les zones de précipitation respectives des fractions protéiques séparées d'une part dans la phase précipitée et d'autre part dans la phase soluble.

L'imbibition du précipité par le surnageant — après séparation par centrifugation des phases apparentes — a été démontrée et son importance mesurée. Il a été ainsi possible d'évaluer les compositions des phases réelles et de réaliser la séparation des fractions protéiques contenues dans ces phases.

On a, en particulier, pu confirmer le fait que la phase précipitée contient, comme la phase soluble, les trois constituants protéine, sel et eau.

En même temps, on a montré comment l'emploi des équilibres avec membrane pouvait constituer une méthode rigoureuse et commode de fractionnement.

Enfin, l'expérience a révélé qu'en première approximation, le nombre des paramètres déterminant les équilibres des systèmes protéine-sel-eau, est beaucoup plus restreint que ne le laisse prévoir la règle des phases de GIBBS, ce qui conduit à supposer que plusieurs de ces paramètres interviennent de façon statistique.

SUMMARY

The equilibrium characteristics of systems of protein-salt-water were studied in the stages where the protein diffuses through all the system (phase equilibrium), or through part of the system (equilibrium with semi-permeable membranes).

The original and systematic investigation established ternary diagrams which precisely and closely represent the characteristics of protein-salt-water systems, and determined the role of different parameters that participate in the equilibria.

The limits of the different ranges of the phases were determined; they differed from the curves representing the composition of the phases, the later showing a multiplicity (contrary to what happens with three pure constituents). The bundle of the tie-lines are unique and constitute the most important element of the diagram.

A study of equilibria with membranes established similar diagrams of the same type, showing the composition of two parts of the system separated by the membrane. The lines obtained by joining the points of the pairs (representing the composition of two parts in equilibrium with the membrane) were shown to be identical with the tie-lines of the phase diagrams.

A method similar to that of SCHREINEMAKERS' was developped for the detection and analysis of compounds formed by large molecules with constituents of a binary mixture. Application of this method to protein-salt-water mixtures showed the existence and the proportions of water bound to the proteins, in so far as the water did not dissolve any ions. There was 0.33 g. water bound to 1 g. of serum albumin.

The amount of bound water is constant, irrespective of the crystalline or amorphous nature and the precipitated or dissolved form of the material. Consequently, the existence and composition of the protein hydrate are independent of the condition or aggregation of the protein. But they depend of factors such as the pH (hydration increases with increasing pH in an acid medium) and the nature of the ions.

The tie-lines are significant and show the point that represent mixtures in which salt concentration in the free water is constant. The variable parameter along the same tie-line shows the concentration of hydrated protein in the mixture.

The solubility of proteins in salt solutions was studied quantitatively. It exhibited a linear variation with salt concentration, while E. J. COHN's logarithmic law was shown to be associated with the superposition of two different processes: the variation in the qualitative distribution of the protein fractions in the different phases and the solubility of that fractions.

The solubility curve of the protein fraction which, after partial precipitation, remained dissolved in a supernatant, in a straight line confounded with the tie-line relative to this supernatant (for total protein contents of 1 % or more).

As far as fractionation is concerned, the protein fractions separated by precipitation — of the one part, the remained dissolved ones, the other part the precipitated one — are respectively identical for all systems which are represented by points situated on the same tie-line: these fractions (e.g. the fraction remaining in solution) show similar solubility curves and electrophoresis diagrams and are present in identical proportions.

It appears that the concentration of hydrated protein in the free water does not take part in the fractionation, that is in the qualitative distribution of the protein fractions in the different phases, and only affects the composition of the equilibrium phases.

When a protein is partially precipitated, the tie-line relative to the equilibrium concerned divides the zone of precipitation of the given protein in two parts which are respectively the zones of precipitation of the protein fractions separated, of the one part in the precipitated phase, the other part in the dissolved phase (e.g. the supernatant).

The degree of imbibition of the precipitate with the supernatant liquid, after separation of the phases by centrifuging, was measured. This made the evaluation of the composition of the phases and separation of protein fractions within these phases possible. Both the precipitated and soluble phase contained all the three constituents, protein, salt and water.

The utilization of equilibria with membranes proved to be a precise and easy method of fractionation.

The investigation indicated that the number of parameters determining the systems protein-salt-water is more limited than was to be expected from the phase laws, suggesting that several of these parameters intervene statistically.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Gleichgewichtscharakteristiken der Protein-Salz-Wasser Systeme wenn das Protein entweder im ganzen System (Phasengleichgewichte) oder in der Hälfte des Systems (Gleichgewichte mit halbdurchlässiger Membran) diffundieren kann, wurden untersucht.

Zum ersten Mal hat man systematisch ternäre Diagramme, die mit Genauigkeit und Kürze die Charakteristiken der Protein-Salz-Wasser Systeme angeben, aufgestellt und die Rolle der verschiedenen in diesen Gleichgewichten einwirkenden Parameter untersucht. Diese Diagramme, die sich auf Systeme mit einem kolloidalen und makromolekularen Bestandteil beziehen, wurden mit solcher Diagrammen verglichen, die man bei Systemen mit drei reinen und wohlbestimmten Bestandteilen (Seife-Salz-Wasser oder Alkohol-Salz-Wasser Typ) kennt.

Die Grenze der verschiedenen Gebiete der Phasenbeständigkeit wurden näher bestimmt ; sie unterscheiden sich von den die Phasenzusammensetzung angebenden Kurven, die vielfältig sind (im Gegensatz zu dem, was bei drei reinen Bestandteilen geschieht). Aber das Konodebündel ist einzig und stellt das wichtigste Element dieser Diagramme dar.

Die Untersuchung der Membrangleichgewichte erlaubte Diagramme gleicher Art, die die Zusammensetzung der beiden durch die Membran getrennten Teile des Systems angeben, aufzustellen. Man konnte beweisen, dass die Koppelpunkte (Punkte, die die Zusammensetzung der in Gleichgewicht beiderseits der Membran stehenden Teile angeben) verbindende Konoden identisch denjenigen der Phasendiagramme sind.

Ein der Schreinemakersschen « Restmethode » vergleichbares wurde ausgearbeitet, was erlaubte zwischen grossen Molekülen und den Bestandteilen der binären Mischung zustandekommender Verbindungen ausfinding zu machen und zu analysieren.

Durch Anwenden dieser Methode für Protein-Salz-Wasser Mischungen konnte das Vorhandensein von an Proteinen gebundenem Wasser bewiesen werden, ferner konnte man den Gehalt an diesem gebundenen Wasser (Wasser ohne ionensolvierende Wirkung) bestimmen. Man fand 0,33 g gebundenes Wasser pro gramm Rinderserumalbumin.

Ob das Protein kristallin oder amorph, gefällt oder gelöst ist, man findet stets denselben Gehalt an gebundenen Wasser. Das Vorhandensein und die Zusammensetzung des Proteinhydrates hängen also nicht von dem Aggregatzustand des Proteins ab. Dagegen sind sie von gewissen Faktoren wie der pH zahl (die Hydratation wächst mit dem pH-Wert in saurem Bereich) und der Natur der vorhandenen Ionen, dessen Einfluss untersucht wurde, abhängig.

Die Bedeutung der Konoden wurde erklärt : sie bilden den geometrischen Ort den Punkte, die Mischungen mit konstanter Salzkonzentration des freien Wassers darstellen. Der wechselnde Parameter längs einer bestimmten Konode ist dann die Proteinhydratkonzentration der Mischung.

Die Löslichkeit der Proteinen in salzigen Lösungen, als Mischungslöslichkeit bestimmt, wurde quantitativ untersucht. Man bewies, dass sie linear in Abhängigkeit zur Salzkonzentration wechselt, und, dass das Cohnsche logarithmische Gesetz von dem gleichzeitigen Vorhandensein zweier verschiedenen Vorgänge abhängt : einerseits der Veränderung der Quantitativen Verteilung der Proteinfraktionen in den verschiedenen Phasen und anderseits der quantitativen Veränderung der Löslichkeit dieser Fraktionen.

Die Löslichkeitskurve der in Lösung gebliebenen Proteinfraktion bei Teilfällung bildet eine gerade Linie, die sich mit der in Bezug zur überstehenden Flüssigkeit (für Gesamproteingehalte über oder gleich 1 p. 100) stehenden Konode deckt. Was das Fraktionnieren betrifft, so hat man bewiesen dass, die durch Fällung getrennten Proteinfraktionen — einerseits die in Lösung gebliebenen, anderseits die gefällten — identisch sind und zwar für alle Punktsysteme einer selben Konode : diese Fraktionen (z.B. die in Lösung gebliebenen) haben selbe Löslichkeitskurve, selbes Elektrophoresediagramm und sind in den selben Verhältnissen vorhanden.

Daraus vergibt sich, dass die Proteinhydratkonzentration des freien Wassers bei dem Fraktionnieren wirkungslos ist, d.h. in der qualitativen Verteilung der Protein fraktionen in den verschiedenen Phasen, dagegen aber nur in der Zusammensetzung der in Gleichgewicht stehenden Phasen einwirkt.

Bei Teilfällung von Proteinen, trennt die auf das herrschende Gleichgewicht beziehende Konode die Proteinfällungszone in zwei Teile, die die betreffenden Fällungszonen der getrennten Proteinfraktionen, einerseits in der gefällten Phase, anderseits in der Löslichen Phase, darstellen.

Das Einsaugen in der Fällung der überstehenden Flüssigkeit — nach Trennung der scheinbarer Phasen durch Zentrifugieren — wurde bewiesen und seine Bedeutung gemessen. So wurde es möglich die Zusammensetzung der reellen Phasen zu ermitteln und die Trennung der in diesen Phasen vorhandenen Proteinfraktionen auszuführen.

Unter anderem konnte man bestätigen, dass die gefällte Phase genau wie die lösliche die drei Grundbestandteile : Protein, Salz und Wasser enthält.

Gleichzeitig wurde gezeigt, wie die Anwendung von Membrangleichgewichte eine genaue und bequeme Fraktionnierungsmethode darstellen kann.

Endlich hat die experimentelle Untersuchung gezeigt, dass in erster Annäherung die Zahl der Parameter, die die Gleichgewichte der Protein-Salz-Wasser Systeme festlegen, weit geringer ist als die durch das Gibbs'sche Phasengesetz vermutete Zahl, was dazu führt anzunehmen, dass mehrere dieser Parameter statistisch einwirken.

РЕЗЮМЕ

Ж. МОССЭ. (Центральная Станция Физиологии растений, Версаль. Диссертация.)

Изучены характеристики равновесий систем « протеин-соль-вода » в том случае когда протеин может диффузировать или во всей системе (равновесия фаз), или в половине системы (равновесия с полупроницаемой перепонкой = мембраной).

Впервые и систематично, были установлены диаграммы охватывающие три вещества, для вполне точного получения характеристик систем « протеин-соль-вода » и была изучена роль различных параметров встречающихся в этих равновесиях. Эти диаграммы, относящиеся к системам имеющим 1 коллоидальный и крупно-молекульный составитель, были сравнены с таковыми уже известными как системы из трех составителей, химически чистых и хорошо определенных (типа « мыло-соль-вода » или « алкоголь-соль-вода »).

Были точно определены границы разных областей существования фаз; они отличаются от кривых указывающих состав фаз, которые (фазы) многочисленны (в отличие от того, что происходит с тремя химически чистыми составителями). Но пучек линий сопряжения только один и он является самым главным элементом этих диаграмм.

Изучение равновесий с мембраной позволило начертить диаграммы такого же типа, как и предыдущие, указывающие состав двух частей системы, разделенной мембраной. Была указана тождественность линий сопряжения, соединяющих точки полученных таким образом пар (точки представляющие составы обеих уравновешенных частей, по ту и другую сторону мембраны) с линиями сопряжения фазовых диаграмм.

Таким образом был создан метод похожий на « метод остатков » Шрейнемакерса, позволяющий открытые и анализ соединений образованных крупными молекулами с составителями двухчленной смеси.

Применяя этот метод к смесям «протеин-соль-вода», было доказано существование воды связанной с протеинами, поскольку эта вода перестает растворять ионы, и эту воду определить. Было найдено, что 0,33 г воды связано одним г бычьего сером-альбумина.

Будь протеин кристаллическим или аморфным, будь он осажденным или растворенным, всегда находят то же количество связанной воды. Существование и состав гидрата протеина не зависят, следовательно, от состояния порядка или агрегации, в котором протеин находится. Зато, они являются функцией таких факторов как pH (гидратация увеличивается вместе с pH в кислой среде) и как природа присутствующих ионов, которых влияние изучено.

Значение линий сопряжения было точно установлено : эти линии являются местом точек представляющих смеси, в которых концентрация соли в несвязанной воде сохраняет постоянную величину. Параметр изменяющийся вдоль некоторой линии сопряжения является концентрацией гидрата протеина в этой смеси.

Растворимость протеинов в соленых растворах, определенная как растворимость некоторой смеси, была изучена количественно. Было доказано, что она изменяется следуя прямой линии, находясь в зависимости от концентрации соли, и что логарифмический закон Е. Ж. Кона (Cohn) относится к совместному действию двух различных явлений : изменение качественного распределения протеиновых фракций в фазах, и количественное изменение растворимости этих фракций.

Растворимость протеиновой фракции, что осталась растворенной в вышенаходящейся жидкости при частичном осаждении, представляется прямой линией, сливающейся с линией сопряжения, касающейся изучаемой жидкости (для концентраций протеина равных или превосходящих 1 р. 100).

Что касается разделения, доказано, что протеиновые фракции разделенные осаждением (1° фракции оставшиеся растворенными и 2° фракции осажденные) являются соответственно тождественными для всех систем представляющих их точки находящиеся на той же линии сопряжения : эти фракции (напр. : растворенные) имеют ту же самую кривую растворимости, ту же диаграмму электрофореза и находятся в таких же пропорциях.

Из этого следует, что концентрация гидрата протеина в несвязанной воде не участвует в разделении, то-есть в качественном распределении

протеинов, но влияет только на состав находящихся в равновесии фаз.

Когда осаждают некоторый протеин частично, линия сопряжения касающаяся данного равновесия разделяет зону осаждения данного протеина на две части, которые являются соответственными зонами осаждения протеиновых фракций разделенных с одной стороны в осажденную фазу, с другой стороны — в фазу растворимую.

Пропитывание осадка заключающей его жидкостью — после разделения видимых фаз центрифугацией — было доказано и значительность его измерена. Таким образом, было возможно оценить состав реальных фаз и осуществить разделение протеиновых фракций, заключающихся в этих фазах.

В частности, удалось подтврердить тот фак, что осажденная фаза содержит, равно как и растворенная, все три составителя : протеин, соль и воду.

В то же время, показано, как употребление равновесий с мембраной может представить точный и удобный метод разделения.

Наконец, опыт показал, что, приблизительно, число параметров, определяющих равновесия систем « протеин-соль-вода », гораздо более ограничено, чем это позволяет предвидеть закон фаз Гиббса (Gibbs), что позволяет предположить, что многие из этих параметров участвуют статистически.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Sörensen (S. P. L.) et Höyrup (M.). — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **12**, 12, (1915).
(2) Pérez (J. J.). — Techniques de Labo. (Masson), 330, (1947).
(3) Monod (J.). — Communication privée, (1950).
(4) Galeotti (G.). — *Z. Physiol. Chem.*, **44**, 461, (1905).
(5) Chick (H.) et Martin (C. J.). — *Biochem. J.*, **7**, 380, (1913).
(6) Mc Meekin (T. L.), Groves (M. L.), Hipp (N. J.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 407, (1954).
(7) Ostwald (W.), Köhler (R.). — *Kolloid Z.*, **43**, 131, (1927).
(8) Perutz (M. F.). — *Disc. Far. Soc.*, **42**, 187, (1946).
(9) Spiro (K.). — *Bei. Chem. Physiol. Pathol.*, **4**, 300, (1904).
(10) Bungenberg de Jong (H. G.), Booy van Staveren (M.). — *Proc. Ned. Akad. Wet.* (Amst.), **45**, 601, (1942).
(11) Galeotti (G.). — *Z. Physiol. Chem.*, **40**, 492, (1904).
(12) Guerrini (X.). — *Z. Physiol. Chem.*, **47**, 287, (1906).
(13) Galeotti (G.). — *Z. Physiol. Chem.*, **48**, 473, (1906).
(14) Henri ((V.). — *Z. Physik. Chem.*, **51**, 31, (1907).
(15) Kauder. — *Arch. Exp. Path. Pharm.*, **20**, 411, (1886).
(16) Hofmeister (Fr.). — *Z. Physiol. Chem.*, **14**, 165, (1890).
(17) Sörensen (S. P. L.), Höyrup (H.). — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **12**,164, (1915).
(18) Sörensen (S. P. L.), Höyrup (H.). — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **12**, 213, (1915).
(19) Sörensen (S. P. L.). — *Z. Physiol. Chem.*, **103**, 316, (1918).
(20) Mc Bain (J. W.), Jameson (E.). — *Trans. Far. Soc.*, **26**, 768, (1930).
(21) Jameson (E.). — *Cold Spring Harbor Symp.*, **6**, 331, (1938).
(22) Dervichian (D. G.), Magnant (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **29**, 655, (1947).
(23) Magnant (C.). — Thèse, (1947).
(24) Dervichian (D. G.), Van den Berg (H. J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30**, 559, (1948).

(25) Dervichian (D. G.). — *Kolloid Z.*, **115**, 76, (1949).
(26) Dervichian (D. G.). — *Disc. Far. Soc.*, **18**, 231, (1954).
(27) Champetier (G.), Néel (J.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **16**, 930, (1949).
(28) Schreinemakers (F. A. H.). — *Z. Physik. Chem.*, **11**, 75, (1893).
(29) Schreinemakers (F. A. H.). — *Z. Physik. Chem.*, **9**, 57, (1892).
(30) Vieweg (J.). — *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **40**, 3876, (1907).
(31) Mc Bain (J. W.), Jenkins (W. J.). — *J. Chem. Soc.* (Lond.), **121**, 2325, (1922).
(32) Duclaux (J.), Titeica (R.). — *C. R. Acad. Sc.*, **189**, 101, (1929).
(33) Greenberg (D. M. et M. M.). — *J. Biol. Chem.*, **94**, 373, (1931).
(34) Greenberg (D. M. et M. M.). — *J. Gen. Physiol.*, **16**, 559, (1933).
(35) Greenberg (D. M.), Gunther (L.). — *J. Biol. Chem.*, **85**, 491, (1929).
(36) Drabkin (D. L.). — *J. Biol. Chem.*, **185**, 231, (1950).
(37) Low (B. W.), Richards (F. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2511, (1954).
(38) Mc Meekin (J. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2884, (1939).
(39) Cohn (E. J.), Mc Meekin (J. L.), Omley (J. L.), Newell (J. M.) et Hughes (W. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 3386, (1940).
(40) Cohn (E. J.), Luetscher (J. A.), Oncley (J. L.), Armstrong (S. H.), Davis (B. D.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 3396, (1940).
(41) Donnan (F. G.), Harris (A. B.). — *J. Chem. Soc.*, **99**, 1554, (1911).
(42) Donnan (F. G.). — *Z. Elektrochem.*, **17**, 572, (1911).
(43) Donnan (F. G.). — *Chem. Rev.*, **1**, 73, (1925).
(44) Scatchard (G.), Batchelder (A. C.), Brown (A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2320, (1946).
(45) Scatchard (G.), Batchelder (A. C.), Zosa (M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2610, (1946).
(46) Gortner (R. A.). — *Ann. Rev. Biochem.*, **1**, 21, (1932).
(47) Guilbot (A.). — *Ind. Agric. Alim.*, **69**, 7, (1952).
(48) Lloyd (D. J.), Phillips (H.). — *Trans. Far. Soc.*, **29**, (1933).
(49) Pauli (W.). — *Ann. Rev. Biochem.*, **3**, 111, (1934).
(50) Edsall (J. T.). — *J. Polym. Sc.*, **12**, 253, (1954).
(51) Adair (G. S.), Adair (M. E.). — *Proc. Roy. Soc.*, *B*, **120**, 422, (1936).
(52) Duclaux (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **23**, 1161, (1941).
(53) Mc Meekin (T. L.), Warner (R. C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2393, (1942).
(54) Low (B. W.), Richard (F. M.). — *Nature*, **170**, 412, (1952).
(55) Boyes-Watson (J.), Davidson (E.), Perutz, (M. F.). — *Proc. Roy. Soc.*, *A*, **191**, 83, (1947).
(56) Sponsler (O. L.), Bath (J. D.), Ellis (J. W.). — *J. Phys. Chem.*, **44**, 996, (1940).
(57) Buchanan (J. T.), Maggis (G. M.), Hasted (J. B.), Robinson (B. G.). — *Proc. Roy. Soc.*, *A*, **213**, 379, (1952).
(58) Wang (J. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4755, (1954).
(59) Bernal (J. D.). — *J. Chim. Phys.*, **50**, C1, (1953).
(60) Grollman (A.). — *J. Gen. Physiol.*, **14**, 661, (1931).
(61) Bull (H. B.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1499, (1944).
(62) Dunford (H. B.), Morrison (J. L.). — *Canad. J. Chem.*, **32**, 558, (1954).
(63) Mc Laren (A. D.), Ottesen (M.). — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **27**, 325, (1950).
(64) Cohn (E. J.). — *J. Biol. Chem.*, **59**, IV, VI, (1924).
(65) Cohn (E. J.). — *Physiol. Rev.*, **5**, 349, (1925).
(66) Sörensen (S. P. L.). — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **15**, nº 11, (1923-25).
(67) Sörensen (S. P. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **47**, 457, (1925).
(68) Sörensen (S. P. L.). — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **18**, nº 5, (1930).
(69) Macheboeuf (M.), Sörensen (M. et S. P. L.). — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **16**, nº 12, (1927).
(70) Florkin (M.). — *J. Biol. Chem.*, **87**, 629, (1930).

(71) GREEN (A. A.). — *J. Biol. Chem.*, **93**, 495, (1931).
(72) MORGAN (V. E.). — *J. Biol. Chem.*, **112**, 557, (1936).
(73) TENOW (M.), SNELLMAN (O.). — *Bioch. Biophys. Acta*, **15**, 395, (1954).
(74) STEINHARDT (J.). — *Cold Spring Harb. Symp.*, **6**, 301, (1938).
(75) DERRIEN (Y.), ROCHE (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **28**, 838, (1946).
(76) BUTLER (A. M.), MONTGOMERY (H.). — *J. Biol. Chem.*, **99**, 173, (1933).
(77) LANGMUIR (I.). — *J. Chem. Phys.*, **6**, 873, (1938).
(78) DERVICHIAN (D. G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **24**, 337, (1942).
(79) BONOT (A.). — *J. Chim. Physique*, **31**, 258, (1934).

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 2-8-1957.
Dépôt légal: 3e trimestre 1957 *N° d'impression: 668*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

7, rue Keppler, PARIS. Tél. : Kléber 23-04, 23-20, 23-21.
Directeur : H. FERRU

ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION :
7, rue Keppler, PARIS. Tél. : Kléber 23-04, 23-20, 23-21.

TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1957

	FRANCE	ÉTRANGER	LE N°
SÉRIE A. — AGRONOMIE			
Abonnement annuel (8 livraisons)	4.700	5.500	650
Abonnement annuel à la partie DOCUMENTATION, servi sous forme de tirés à part	400	450	—
SÉRIE B. — AMÉLIORATION DES PLANTES			
Abonnement annuel (4 livraisons)	2.300	2.700	650
Abonnement annuel à la partie DOCUMENTATION, servi sous forme de tirés à part	400	450	—
SÉRIE C. — ÉPIPHYTIES			
Abonnement annuel (4 livraisons)	2.300	2.700	650
Abonnement annuel à la partie DOCUMENTATION, servi sous forme de tirés à part	300	350	—
SÉRIE D. — ZOOTECHNIE			
Abonnement annuel (4 livraisons)	1.100	1.300	325
SÉRIE E. — TECHNOLOGIE			
Abonnement annuel (4 livraisons)	2.300	2.700	650

Chaque demande de changement d'adresse doit être accompagnée de 30 fr. en timbres-poste.

Les abonnements sont reçus chez tous les libraires ainsi qu'au siège de l'Institut 7, rue Keppler (régie des publications, C.C.P. PARIS, 90,64-43).

TABLE DES MATIÈRES

X 709.118